



ALICE PEREIRA ZANZINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
ALFACE LISA (*Lactuca sativa* var. *capitata*) E EFEITO
ANSIOLÍTICO NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS - MG
2024**

ALICE PEREIRA ZANZINI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ALFACE LISA (*Lactuca sativa* var. *capitata*) E EFEITO ANSIOLÍTICO NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor(a).

Profa. Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Dra. Isabela Di Chiacchio

Coorientador

LAVRAS - MG

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Zanzini, Alice Pereira.

Avaliação da atividade antioxidante da alface lisa (*Lactuca sativa* var. *capitata*) e efeito ansiolítico no modelo *zebrafish* (*Danio rerio*). / Alice Pereira Zanzini. - 2024.

91 p.: il.

Orientador(a): Elisângela Elena Nunes Carvalho.

Coorientador(a): Luis David Solis Murgas, Isabela Di Chiacchio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Ansiedade. 2. Plantas Medicinais. 3. efeito ansiolítico. I. Nunes Carvalho, Elisângela Elena. II. Murgas, Luis David Solis. III. Chiacchio, Isabela Di. IV. Título.

ALICE PEREIRA ZANZINI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ALFACE LISA (*Lactuca sativa* var. *capitata*) E EFEITO ANSIOLÍTICO NO MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY LETTUCE (*Lactuca sativa* var. *capitata*) AND ANXIOLYTIC EFFECT IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutor(a).

APROVADA em 19 de Julho de 2024

Dr. Mário Sérgio Lorenço UFLA

Dr. Hanna Elisia Araújo de Barros FAM

Dr Alexandre Alves de Carvalho UFLA

Prof. Dr. Dr Luis David Solis Murgas UFLA

Profa. Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Dra. Isabela Di Chiacchio

Coorientador

LAVRAS - MG

2024

*A Deus, por causa dEle sempre tive esperança e fé. E a pessoa mais importante da minha vida, minha querida Mãe, que nunca deixou eu me sentir totalmente só e esteve sempre ao meu lado, tanto nos momentos bons quanto nos momentos ruins. **Dedico.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir e sempre renovar as minhas energias dia após dia na caminhada da vida.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares por todas as vivências e experiências edificantes durante a jornada acadêmica.

A minha orientadora, professora Elisângela Elena Nunes Carvalho, que confiou e nunca deixou de acreditar no meu potencial e me incentivou até o fim. Muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa profissionalmente e pessoalmente também!

Aos Colegas do laboratório de Pós- Colheita de Frutas e Hortaliças e ao professor José Eduardo Vilas Boas por ser sempre solícito e disponibilizar o que for preciso para execução das análises.

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Lavras e aos colegas do laboratório. Em especial a minha coorientadora Isabela Di Chiacchio e professor Luis David Murgas. Muito obrigado, admiro muito vocês!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimento também a minha família e meus amigos que foram essenciais, pelas conversas e pelo apoio e incentivo. Vocês me proporcionaram o refúgio e o descanso mental que eu tanto precisava em dias difíceis.

Minha mãe, que orou por mim e torceu por mim como ninguém.

MUITO OBRIGADA!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung.

RESUMO

Os Transtornos de ansiedade são desórdenes mentais comuns na atualidade. A forma mais empregada para tratamento é a utilização de medicamentos alopáticos que atuam diretamente no sistema nervoso central, porém, efeitos colaterais são frequentemente relatados. As plantas medicinais podem ser vistas como ótimo recurso para o manejo de sintomas relacionado à saúde mental, visto que, se utilizadas de maneira adequada, possuem eficácia e segurança de uso com vantagem dos efeitos colaterais serem brandos ou até mesmo inexistentes. A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça muito utilizada na culinária e também por suas propriedades medicinais e calmantes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo caracterizar os compostos bioativos presente na alface lisa (*Lactuca sativa* var *capitata*) e o efeito ansiolítico de diferentes concentrações do extrato em ensaios comportamentais no modelo experimental *zebrafish* (*Danio rerio*). Primeiramente realizou-se a otimização extrativa com o intuito de identificar o solvente mais eficaz. Respeitando os resultados obtidos na otimização extrativa, utilizamos o extrato aquoso para realização dos experimentos. As análises bioquímicas demonstraram que o extrato aquoso de alface lisa (*Lactuca sativa* var *capitata*) possui um perfil de compostos antioxidantes e fenólicos, que estão associados com a ação ansiolítica do vegetal através de redução do estresse oxidativo e afinidade com receptores GABA no SNC. O ensaio comportamental demonstrou que o extrato na dose 3 (9,0g.L⁻¹) foi capaz de reduzir o comportamento tipo-ansioso em relação aos demais tratamentos e na dose 4 (12g.L⁻¹) foi capaz de promover um estado de sono no *zebrafish*, o que pode ser comprovado pelo tempo que o animal permaneceu imóvel. O presente trabalho constatou o efeito ansiolítico do extrato aquoso de folhas de alface (*L. sativa* var. *capitata*), sendo capaz de promover efeitos neuroprotetivos no SNC e diminuição de sintomas de estresse e ansiedade.

Palavras-chave: ansiedade; depressão; plantas medicinais; estresse oxidativo; receptores GABA; otimização extrativa.

ABSTRACT

Anxiety disorders are common mental disorders today. The most commonly used form of treatment is the use of allopathic medicines that act directly on the central nervous system, however, side effects are frequently reported. Medicinal plants can be seen as a great resource for managing symptoms related to mental health, since, if used appropriately, they are effective and safe to use with the advantage of side effects being mild or even non-existent. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a vegetable widely used in cooking and also for its medicinal and anxiolytic properties. Therefore, this work aimed to characterize the bioactive compounds present in lettuce (*Lactuca sativa* var *capitata*) and the anxiolytic effect of different concentrations of the extract in behavioral assays in zebrafish (*Danio rerio*). Firstly, was made extractive optimization with the intention of identifying the most effective solvent. Respecting the results obtained in extractive optimization, we used the aqueous extract to carry out the experiments. Biochemical analyzes demonstrated that the aqueous extract of lettuce (*Lactuca sativa* var *capitata*) has a lot of antioxidant and phenolic compounds, which are associated with the anxiolytic effect of the vegetable through the reduction of oxidative stress and affinity with GABA receptors in the CNS. The behavioral test demonstrated that the extract at dose 3 (9.0g.L⁻¹) was able to reduce anxiety-like behavior in relation to the other treatments and at dose 4 (12g.L⁻¹) it was able to promote a state of sleep in *zebrafish*, which can be proven by the time that the animal remained motionless. The present study found the anxiolytic effect of the aqueous extract of lettuce leaves (*L. sativa* var. *capitata*), being able of promoting neuroprotective effects on the CNS and reducing symptoms of stress and anxiety.

Keywords: anxiety; depression; medicinal plants; oxidative stress; GABA receptors; extractive optimization.

INDICADORES DE IMPACTO

Indivíduos apresentando transtornos de ansiedade e outras doenças relacionadas à saúde mental estão em constante crescimento na sociedade. A ocorrência de transtornos de ansiedade na população mundial é de 3,6%, sendo que este número aumenta para 5,6% no continente americano e 9,6% no Brasil, colocando o país, no ranking de um dos mais ansiosos do mundo. A forma mais empregada para tratamento é a utilização de medicamentos da classe dos benzodiazepínicos, que atuam diretamente no sistema nervoso central e causam inúmeros efeitos colaterais. A utilização das plantas medicinais como forma de tratamento para essas desordens podem ser vistas como ótimo recurso, visto que, se utilizadas de maneira adequada, possuem eficácia e segurança de uso com vantagem dos efeitos colaterais serem brandos ou até mesmo inexistentes. A fitoterapia é uma técnica milenar utilizada pelas mais diversas civilizações, que já detiam conhecimento sobre os poderes curativos das plantas. A evolução da ciência veio para enriquecer cada vez mais as descobertas de novos princípios ativos, trazendo avanços para o tratamento de diversas patologias, incluindo doenças relacionadas à saúde mental. A presente tese investigou o efeito ansiolítico presente no extrato da hortaliça alface (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*), vegetal amplamente utilizado pela população mundial, que apresenta resultados promissores para o tratamento de doenças relacionadas à ansiedade e depressão. Em relação à economia, alternativas de terapias que sejam eficazes e acessíveis à população são muito interessantes, visto que reduziriam a dependência de setores tradicionais, como a indústria farmacêutica e traria melhoria na qualidade de vida da sociedade. A redução de gastos provenientes com a saúde pública através da diminuição de pessoas apresentando distúrbios psiquiátricos graves seria um grande avanço que beneficiaria a economia e a saúde dos indivíduos. O trabalho também incentiva a sustentabilidade visto que a hortaliça é facilmente cultivada e bastante acessível. Assim, a alface (*Lactuca sativa* L.) tem potencial para ser utilizada como aliada para tratamento de doenças mentais. Faz-se necessário o incentivo à pesquisa para o desenvolvimento do produto acabado e integração dos profissionais de saúde para o incentivo ao conhecimento, divulgando todos os benefícios proporcionados por essa prática e realização da distribuição para a comunidade.

IMPACT INDICATORS

Individuals with anxiety disorders and other mental health-related illnesses are constantly growing in society. The occurrence of anxiety disorders in the world population is 3.6%, and this number increases to 5.6% in the American continent and 9.6% in Brazil, placing the country in the ranking of one of the most anxious in the world. The most used form of treatment is the use of benzodiazepine drugs, which act directly on the central nervous system and cause numerous side effects. The use of medicinal plants as a form of treatment for these disorders can be seen as a great resource, since, if used properly, they have efficacy and safety of use with the advantage of side effects being mild or even non-existent. Phytotherapy is an ancient technique used by the most diverse civilizations, which already had knowledge about the healing powers of plants. The evolution of science has come to increasingly enrich the discoveries of new active ingredients, bringing advances to the treatment of various pathologies, including diseases related to mental health. The present work investigated the anxiolytic effect present in the vegetable (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*), a vegetable widely used by the world population, which presents promising results for the treatment of diseases related to anxiety and depression. Regarding the economy, alternative therapies that are effective and accessible to the population are very interesting, as they would reduce dependence on traditional sectors, such as the pharmaceutical industry and would bring an improvement in the quality of life of society. The reduction of public health expenditures through the reduction of people with serious psychiatric disorders would be a major breakthrough that would benefit the economy and the health of population. The work also encourages sustainability, since the vegetable is easily grown and very accessible. Thus, lettuce (*Lactuca sativa* L.) has the potential to be used as an ally for the treatment of mental illnesses. It is necessary to encourage research for the development of the finished product and the integration of health professionals to encourage knowledge, disseminating all the benefits provided by this practice and distributing it to the community.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	10
2 – REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 – Transtorno de Ansiedade	11
2.1.1 – Abordagem Alopática no Tratamento do Transtorno da Ansiedade	14
2.2 – Alface: Origem, Produção Nacional e Benefícios Gerais à Saúde Humana.	19
2.2.1 – Atividade Ansiolítica da Alface.	24
2.2.2 – Atividade Antioxidante da Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	31
2.2.3- Otimização da extração de compostos bioativos	38
2.3 – <i>Zebrafish</i> como Modelo Animal na Pesquisa Científica	39
2.4- Utilização do <i>Zebrafish</i> como Modelo Comportamental	44
3 – Referências Bibliográficas	49
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	63

1 – INTRODUÇÃO

As rotinas excessivas de trabalho, o sedentarismo e alimentação inadequada são hábitos que trazem prejuízos à saúde física e mental da população. Atualmente, pessoas que apresentam quadros de ansiedade são cada vez mais frequentes, chegando a atingir um percentual de 30% da população mundial (WHO, 2017).

O emprego de medicamentos alopáticos que atuam diretamente no sistema nervoso central é a forma mais utilizada de tratamento, porém, efeitos colaterais são frequentemente relatados. A utilização de fitoterápicos como alternativa terapêutica é validado, reconhecido e estimulado pela Organização Mundial da Saúde, não só por sua importância na cura e prevenção de doenças, mas também uma alternativa na redução de custos de tratamentos em programas de atenção primária à saúde pública (Sousa et al., 2008). O Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira relaciona 28 espécies com propriedades terapêuticas (ANVISA, 2016), enquanto o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira, relaciona 85 espécies com potencial fitoterápico, entre espécies nativas e exóticas (ANVISA, 2021). A alface (*Lactuca sativa* L.) é um vegetal folhoso, pertencente a família Asteraceae, seu centro de origem remonta à região Mediterrânea, chegando ao Brasil no século XVI por intermédio dos colonizadores portugueses (EMBRAPA, 2023). Apesar de não constar nas listagens de fitoterápicos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde, sua utilização é amplamente difundida. Existem estudos que apontam para os potenciais efeitos ansiolíticos e antioxidantes da alface em modelos animais (Harsha, Anilakumar, 2013; Komaki et al., 2014; Hong et al., 2018; Kim, 2019; Jo et al., 2021; Ahn et al, 2023) porém, pesquisas que elucidam a eficácia e seguridade do uso da alface para problemas psiquiátricos ainda são escassos.

Tendo em vista o panorama atual de crescimento acelerado de transtornos psiquiátricos na população mundial, e a escassez de estudos voltados a elucidar os efeitos dos compostos presentes na alface como medida mitigadora de tais transtornos, o presente estudo pretende investigar os compostos bioativos do extrato da hortaliça alface (*Lactuca sativa* var. *capitata*) assim como avaliar o efeito ansiolítico através de ensaios comportamentais com o modelo experimental *zebrafish* (*Danio rerio*).

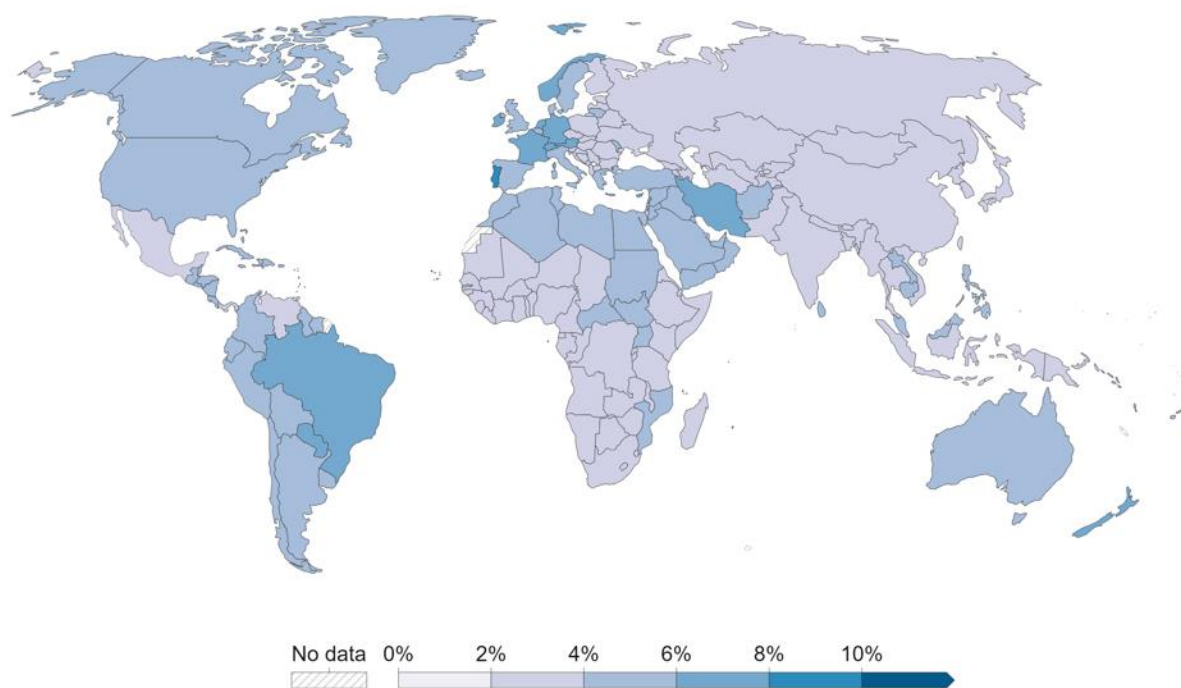
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtorno de Ansiedade

A ansiedade é reconhecida como o mal do século XXI, não fazendo distinção de gênero, raça e idade, acometendo crianças, adolescentes, jovens, adultos e idosos em diferentes graus de intensidade e gravidade (Fonseca, 2023). A ocorrência do transtorno de ansiedade na população mundial é de 3,6%, sendo que este número aumenta para 5,6% no continente americano e 9,6% no Brasil, colocando o país, no ranking de um dos mais ansiosos do mundo (OMS, 2017; Fernandes et al., 2018; IHME OUR WORLD IN DATA, 2019). Assim como em outras psicopatologias, o TA é mais comum em mulheres (9,6%) do que em homens (5,4%) e afeta todas as faixas etárias.

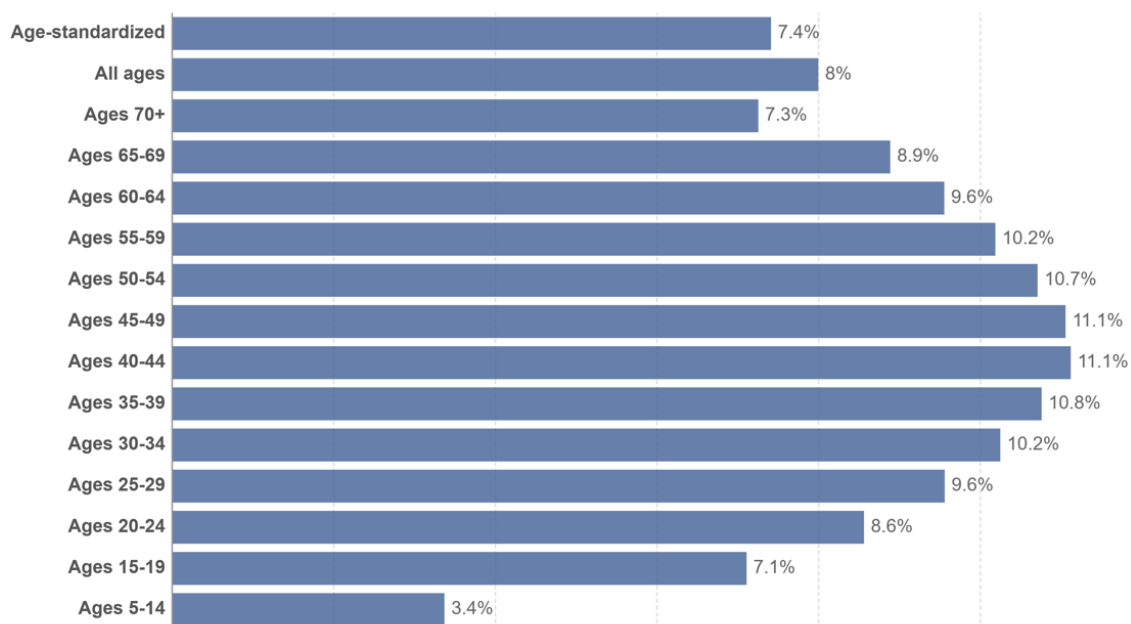
As Figuras 1, 2 e 3, a seguir, ilustram como o Brasil encontra-se entre os países com maior porcentagem estimada de pessoas com transtornos de ansiedade (Figura 1), ocorrendo em todas as faixas etárias (Figura 2), com prevalência maior nas mulheres (Figura 3), diagnosticadas ou não, com base em amostragens representativas, dados médicos e modelos estatísticos (IHME OUR WORLD IN DATA, 2019).

Figura 1 – Distribuição percentual de pessoas com transtornos de ansiedade em nível mundial.



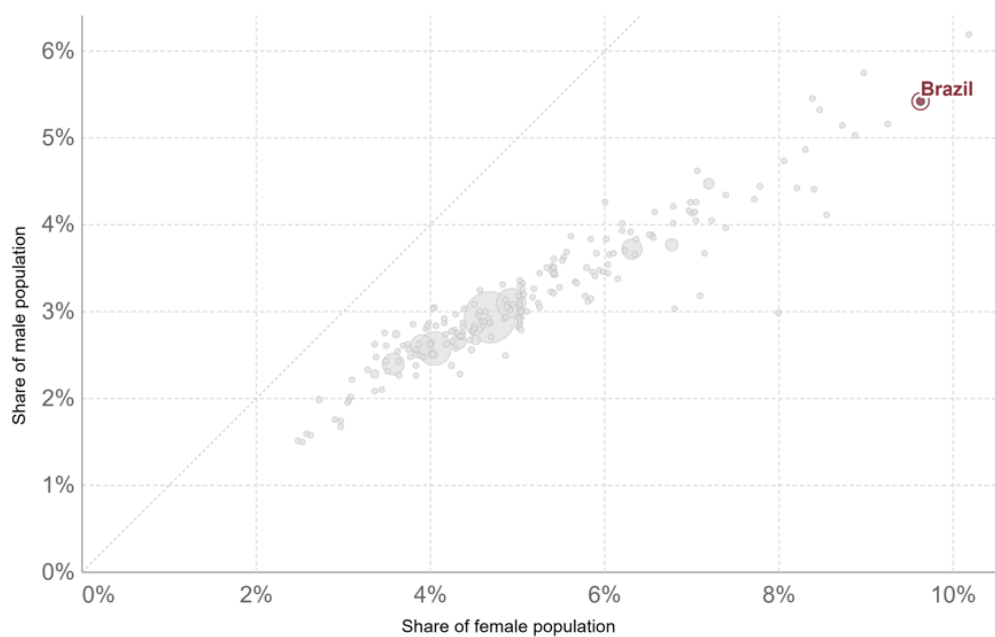
Fonte: IHME OUR WORLD IN DATA (2019).

Figura 2 – Distribuição percentual de pessoas com transtornos de ansiedade, por faixa etária, no Brasil.



Fonte: IHME OUR WORLD IN DATA (2019).

Figura 3 – Distribuição percentual de pessoas com transtorno de ansiedade, por sexo, no Brasil.



Fonte: IHME OUR WORLD IN DATA (2019).

Em decorrência das alterações no modo de vida contemporâneo, o surgimento de doenças mentais têm-se tornado cada vez mais comum na população mundial. O estresse engloba uma série de transtornos psicológicos como ansiedade, depressão, insônia, ataques de pânico, entre outros. A ansiedade representa um estado cerebral relacionado a problemas externos, alterando o funcionamento das fibras nervosas do sistema nervoso central.

Essa percepção alterada ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), acarretando sintomas neurológicos, como taquicardia, aumento da respiração, tensão muscular, sudorese, por meio da ativação de sistemas cerebrais associados ao sistema de luta/fuga (Braga et al., 2010). Em estado normal, o organismo tende a voltar a homeostasia, porém, a ansiedade passa a ser crônica quando excedem os níveis de normalidade e frequência, tornando-se patológica e altamente prejudicial. A ansiedade/estresse é considerada um tipo de comportamento fisiológico do organismo, porém, ela passa a ser patológica quando interfere ou prejudica o cotidiano dos indivíduos, impedindo-os de desempenhar normalmente suas atividades diárias, interferindo negativamente nas relações pessoais, profissionais e na qualidade de vida (Sousa et al., 2008).

O sono representa um mecanismo fisiológico crucial para manter o organismo em equilíbrio, pois desempenha funções importantes sobre a saúde física e mental, promovendo adequada aprendizagem cerebral e também atuando na correta funcionalidade hormonal, imunológica e na memória (Barros et al., 2019). Uma boa qualidade do sono desempenha vários benefícios à saúde, inclusive, está associado ao controle da ansiedade e do estresse, regulação de hormônios, combatendo a obesidade e o diabetes (Barros et al., 2019). Porém, os sintomas de ansiedade estão diretamente envolvidos na garantia de um bom desempenho do sono. Já foram identificados uma série de distúrbios relacionados ao sono, entre elas: dificuldade de adormecer ou permanecer dormindo, problemas para permanecer acordado, problemas para conseguir manter uma rotina regular de sono, comportamentos incomuns durante a noite (Barros et al., 2019).

A insônia é a dificuldade de iniciar o sono, mantê-lo continuamente durante a noite ou o despertar antes do horário desejado e sua etiologia pode estar relacionadas a problemas do dia-a-dia, estresse, doenças, medicamentos, alimentação ou mudança de hábitos. A má qualidade do sono pode gerar uma série de problemas físicos e mentais (Kim et al., 2019), incluindo cansaço persistente, irritação, falta de atenção e queda de rendimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2022). A privação crônica de sono está relacionada ao aumento do risco de desenvolver doenças crônicas como doenças cardiovasculares, diabetes, além de ocorrer o aumento do apetite e a ingestão de alimentos, diminuição a sensibilidade à insulina e

a tolerância à glicose, prejudica a resposta imunológica, perturba o humor e aumenta a vulnerabilidade a falhas de atenção (Lessa et al., 2020). Atualmente, um terço da população mundial é afetada com problemas de insônia, sendo que mulheres e pessoas idosas são mais propensas ao desenvolvimento desta patologia (Oliveira et al., 2024).

2.1.1 Abordagem Alopática no Tratamento do Transtorno da Ansiedade

Evidências atuais relacionam o estresse oxidativo como responsável por vários desequilíbrios psiquiátricos, incluindo transtorno de ansiedade, estados depressivos e perda da qualidade do sono, embora os mecanismos e padrões causadores desses distúrbios não sejam ainda totalmente compreendidos (Fedoce et al., 2018). O Sistema Nervoso Central SNC é vulnerável a processos oxidativos que ocorrem no organismo, portanto, danos causados por espécies reativas de oxigênio danificam células neuronais, deste modo podem ser consideradas como causas primárias e agravantes dos sintomas de doenças psiquiátricas (Fedoce et al., 2018).

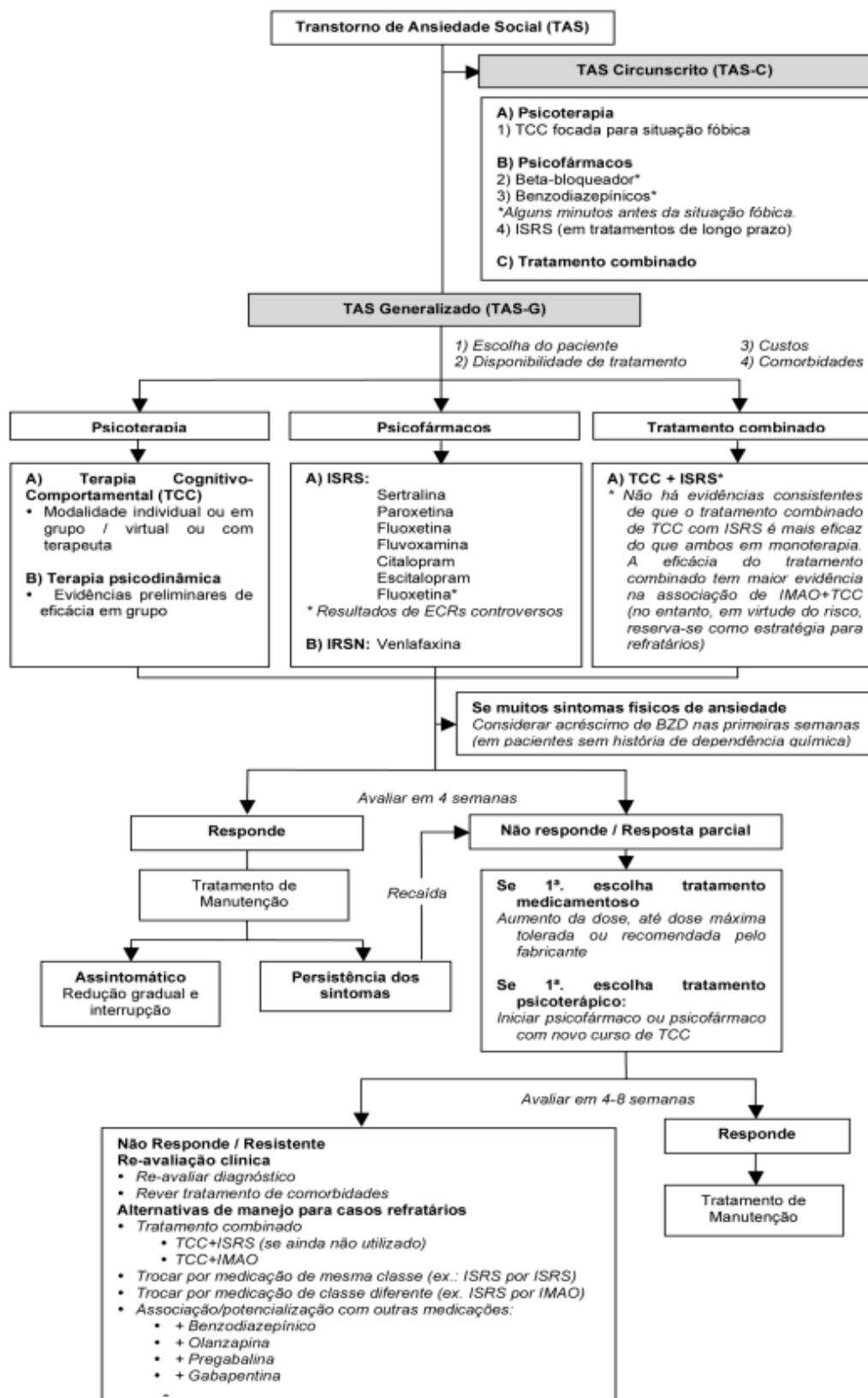
O tratamento convencional para os transtornos de ansiedade, estados depressivos e consequentes distúrbios do sono envolvem a utilização de terapias cognitivas-comportamentais, terapias psicodinâmicas, medicamentos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), inibidores de monoaminoxidase (IMAO), benzodiazepínicos (BZD) e beta-bloqueadores ou a combinação dos tratamentos citados (Levitan et al., 2011), conforme ilustra o fluxograma mostrado na Figura 4.

Diversos fármacos, provenientes das mais variadas classes terapêuticas, apresentam comprovada eficácia no manejo de transtornos psiquiátricos, como a ansiedade e insônia (Faustino et al., 2010). Para o tratamento destes transtornos, algumas classes farmacológicas são prescritas de forma individual ou associada, como os antidepressivos, betabloqueadores, anticonvulsivantes, antipsicóticos e os benzodiazepínicos (Leão et al., 2021). Sendo que o uso de benzodiazepínicos e antidepressivos são os mais empregados como forma de tratamento alopático (Sousa et al., 2015).

Os benzodiazepínicos estão incluídos na classe de fármacos ansiolíticos mais influentes no tratamento dos estados de ansiedade (Fagundes et al., 2024; Ferrazza et al., 2010). São divididos em subclasses, de acordo com o tempo de duração de ação no organismo, sendo que: longa ação, como o diazepam; média ação, como o clonazepam; e curta ação como midazolam. Os de curta ação são mais utilizados como hipnóticos, enquanto, aqueles com ação mais longa são utilizados mais comumente como ansiolíticos (Fagundes et al., 2024). São lipossolúveis, atuando rapidamente no sistema nervoso central (SNC). O

mecanismo de ação se dá através da ativação do receptor GABA que é um importante e abundante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso dos mamíferos, possibilitando assim, a hiperpolarização celular pelo aumento do influxo de Cl^- , ocasionando efeitos inibitórios no sistema nervoso central, resultando na redução da propagação dos impulsos excitatórios (CME INSTITUTE, 2005). Por atuar no sistema nervoso central podem causar dependência (Griffin et al., 2013). Ademais, o uso indiscriminado desta classe de medicamentos causa malefícios à saúde do indivíduo como amnésia, sedação, alterações cognitivas e disfunções sexuais (Sousa et al., 2015 Rajaram et al. 2020). Como mostra a Figura 4, o tratamento inicial do TAG deve ser de curta duração com medicamentos alopáticos, com uma tentativa de retirada gradual da medicação após 6 a 8 semanas de tratamento e posterior adoção de fitoterápicos, visando minimizar a ocorrência de efeitos colaterais. Tendo em vista que essas substâncias apresentam efeitos colaterais indesejados, justifica-se a busca por alternativas mais eficazes e com menores efeitos colaterais no tratamento destas desordens (Faustino et al., 2010).

Figura 4 – Fluxograma da Associação Médica Brasileira para o tratamento convencional do transtorno de ansiedade.



Fonte: Levitan et al., (2011).

2.1.2 Abordagem Fitoterápica no Tratamento do Transtorno de Ansiedade

A preocupação maior no uso de fármacos convencionais no tratamento da ansiedade e insônia é a utilização abusiva ou prolongada dos mesmos, que podem gerar efeitos mais agressivos, visto que quando usados em doses maiores que o recomendado e por um período maior que o necessário para o tratamento, causam problemas de tolerância, dependência e crises de abstinência durante a retirada, fatores farmacológicos como tempo de meia-vida e lipossolubilidade também influenciam nas crises de dependência e abstinência (Nunes; Bastos, 2016).

Atualmente, o uso das terapias alternativas é aceito pelo Sistema Único de Saúde (SUS) por meio da Portaria nº 97, de 03 de maio de 2006 que regulamenta a adoção de algumas práticas em âmbito nacional, como: medicinal tradicional chinesa/ acupuntura, homeopatia, plantas medicinais, fitoterapia, termalismo social/ crenoterapia e medicina antroposófica. Meditação e yoga também são práticas terapêuticas comprovadas que podem ser utilizadas para o manejo de transtornos de ansiedade, redução do estresse e melhora do sono (Medeiros, 2017; Levine et al., 2017). Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou estratégias e planos de ação voltados a fomentar a medicina tradicional e complementar em nível global, estabelecendo os seguintes objetivos: 1) construir a base de conhecimento necessária para a gestão ativa da medicina complementar, através de políticas públicas apropriadas; 2) fortalecer a garantia de qualidade, segurança, uso adequado e eficácia da medicina tradicional e complementar, regulamentando produtos, práticas e praticantes; e 3) promover a cobertura universal de saúde através da integração de métodos tradicionais e serviços de medicina complementar na prestação de serviços de saúde e cuidados de saúde próprios (WHO, 2022).

Nas Américas, o Brasil foi um dos primeiros países a inserir a utilização de fitoterápicos no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS), através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), com a publicação da Portaria GM/MS Nº 971 de 3 de maio de 2006 (MS, 2006). Atualmente a disponibilização de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde, concentra espécies da flora nativa brasileira e também espécies exóticas. O Caderno Nº 31 da série Cadernos de Atenção Básica do Ministério da Saúde relaciona 12 espécies nativas e exóticas disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (MS, 2012), sendo tais espécies constantes também na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (MS, 2022).

Outros estudos demonstram que a combinação de terapia cognitiva, exercícios físicos e boa nutrição são eficientes para a diminuição dos sintomas de ansiedade, depressão e a insônia (Kozasa et al., 2010; Santos et al., 2021). *Mindfulness*, um tipo de meditação, apresenta resultados favoráveis para os transtornos psiquiátricos, por meio da prática de atenção plena e práticas de respiração (Azevedo et al., 2022).

O emprego das plantas medicinais para o tratamento de doenças é conhecida desde os primórdios da humanidade. As farmacopeias tradicionais descrevem inúmeras espécies vegetais com as mais variadas indicações terapêuticas. Sabe-se que cerca de 25% dos medicamentos encontrados na indústria farmacêutica apresentam algum tipo de princípio ativo derivado das plantas medicinais (Viegas et al., 2006). Desse modo, o uso das plantas medicinais demonstra ser uma forma de tratamento promissora, segura e eficaz para patologias como ansiedade, depressão e insônia, com a vantagem de produzirem poucos ou nenhum efeito colateral (Dutra et al., 2016).

A fitoterapia é fortemente indicada para redução da ansiedade e induzir e melhorar a qualidade do sono (Kurebayashi et al., 2016). Atualmente diversas plantas medicinais são conhecidas e utilizadas como tratamento alternativo ou complementar para o controle dos transtornos psiquiátricos, e por isso, vêm sendo exaustivamente estudadas. Plantas medicinais como kava-kava (*Piper methysticum*), Valeriana (*Valeriana officinalis*), Melissa (*Melissa officinalis*), Selo-de-Salomão (*Polygonatum sibiricum*) e Maraujá (*Passiflora incarnata*), já possuem sua eficácia comprovada dos efeitos sedativos e capacidade promotora do sono por meio de pesquisas científicas (Faustino et al., 2010).

Estudos indicam que polifenóis, flavonóides e outros metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais afetam direta ou indiretamente o sistema nervoso central, podendo ser empregado no tratamento de transtornos psiquiátricos (Widmer, 2022).

A seleção de uma planta com potencial atividade de interesse é um passo muito importante para o estudo farmacológico. A escolha pode ser feita de várias formas, sendo que o uso tradicional pela medicina popular, conhecida como etnofarmacologia é a estratégia mais comum (Albuquerque; Hanazaki, 2006). O entendimento do mecanismo de ação, a segurança e eficácia na utilização constitui, ainda, um desafio para a ciência (Carlini et al., 2006; Harsha; Anilakumar, 2013). Tendo em vista a existência da grande diversidade de plantas com potencial medicinal, a quantidade de substâncias terapêuticas que já foram aprovadas para o uso clínico ainda é muito baixa. Isso se deve, principalmente, às complexas misturas de componentes químicos existentes nas plantas medicinais e o seu mecanismo de ação, que na maioria das vezes é bastante amplo e complexo (SOUSA et al., 2008).

As plantas que apresentam ações biológicas e farmacológicas com potencial uso terapêutico para doenças psiquiátricas, especificamente, os distúrbios da ansiedade devem ser usados na pesquisa objetivando a comprovação da eficácia de novas substâncias. Os extratos vegetais e os constituintes com efeitos psicoterapêuticos demonstrados em modelos animais de ansiedade podem servir para melhores avaliações com a possibilidade de serem candidatos para o uso clínico, merecendo, portanto, uma maior atenção na comunidade científica (Sousa et al., 2008).

2.2 Alfaca: Origem, Produção Nacional e Benefícios Gerais à Saúde Humana

A origem da alface cultivada atualmente é alvo de controvérsias em torno de três teorias originais. A primeira postula que a espécie moderna de alface (*Lactuca sativa* L.) evoluiu a partir de uma linhagem selvagem da própria espécie *Lactuca sativa*. A segunda teoria aponta para a variedade *Lactuca serriola* como ancestral direta de *Lactuca sativa* L. Finalmente, a terceira teoria aponta para evidências que sugerem que a variedade hoje cultivada, (*Lactuca sativa* L.), foi resultado de mutações cumulativas durante o longo tempo de cultivo da hortaliça. Atualmente, a tendência mais aceita é que a hibridação entre espécies ocorrida ao longo do tempo de cultivo, é preferida em relação à teoria geralmente aceita de que *Lactuca sativa* L. originou-se por descendência direta da espécie ancestral *Lactuca serriola* (Lindqvist, 1960).

Os primeiros registros da existência da alface como uma hortaliça cultivada remetem às pinturas em tumbas no antigo Egito, mostrando que uma variedade de alface de folhas longas já era cultivada no ano 4.500 a.C. Em 1924, o egiptólogo alemão Ludwig Joseph Gustav Keimer classificou a variedade que crescia no antigo Egito como pertencente a *Lactuca sativa* var. *longifolia*, apresentando folhas lanceoladas e pontiagudas (Keimer, 1924).

Do Egito, o cultivo da variedade primitiva da alface se espalhou para a Grécia e, posteriormente para Roma. Na Grécia, Hipócrates (460 – 370 a.C.), considerado o “pai da medicina”, exaltava os efeitos calmantes da hortaliça e em Roma, o historiador e naturalista Plínio, o “velho” (23-79 d.C.) divulgava as propriedades indutoras do sono da alface.

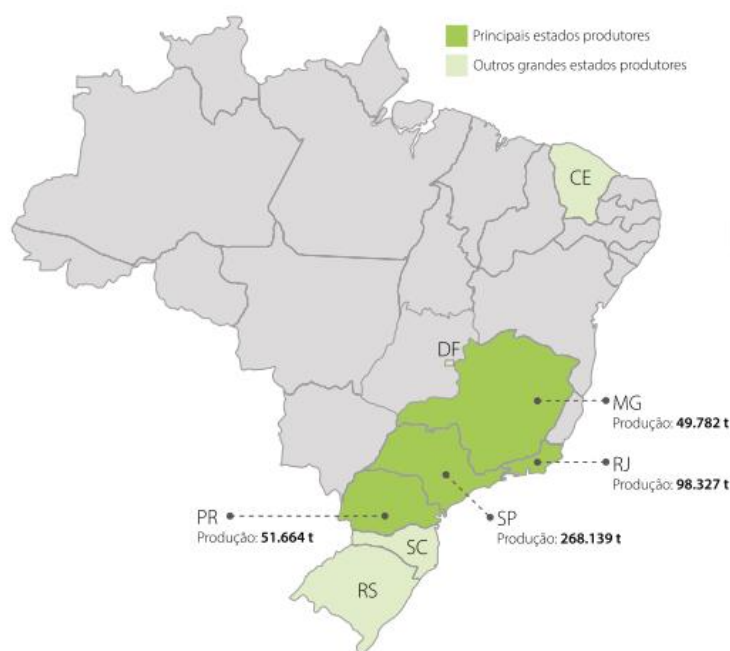
Mais tardiamente, entre 600 e 900 d.C. a alface foi introduzida no Oriente (Oriente Médio e China). Por volta do século XVI, a alface já era cultivada em todo o redor da Europa (Lindqvist, 1960). Nas Américas, a alface foi introduzida em 1494 com as expedições de Cristóvão Colombo e, particularmente no Brasil, foi introduzida em 1650 com a colonização

portuguesa (EMBRAPA, 2023). Em nível mundial, é a hortaliça folhosa mais consumida, sendo produzida em todos os continentes.

Atualmente, os maiores produtores de alface no mundo, são a China que lidera a lista, com 23,6 milhões de toneladas (52% da produção mundial), seguida de Estados Unidos, Índia, Espanha e Itália (CAMPO & NEGÓCIOS, 2021). O Brasil ocupa o sexto lugar, na produção mundial de alface.

No Brasil a hortaliça é plantada principalmente na região Centro-Sul. Entretanto, por se tratar de um produto altamente perecível e largamente consumido, é cultivada em todas as regiões, especialmente em áreas próximas dos grandes centros, os chamados “cinturões verdes”. O estado de São Paulo é o maior produtor e o maior consumidor de alface no país (cerca de 268 mil toneladas/ano), seguido do Rio de Janeiro (cerca de 98.000 toneladas/ano), Paraná (cerca de 50 mil toneladas/ano) e Minas Gerais (cerca de 50 mil toneladas/ano) (EMBRAPA, 2023). (Figura 5).

Figuras 5 – Principais estados produtores de alface no Brasil



Fonte: EMBRAPA (2023).

As cultivares de alface atualmente disponíveis no mercado brasileiro de sementes podem ser agrupadas em seis tipos morfológicos principais, com base na formação de cabeça e tipo de folhas (EMBRAPA, 2009), representadas na Figura 6.

Figura 6- Repolhuda Lisa ou Manteiga (com 26 cultivares; Figura 6A), a Repolhuda Crespa ou Americana (com 20 cultivares; Figura 6B), a Solta Lisa (com 9 cultivares; Figura 6C), a Solta Crespa (com 17 cultivares; Figura 6D), a Solta Crespa Roxa (com 7 cultivares; Figura 6E), a Tipo Romana (com 3 cultivares; Figura 6F).

A - Repolhuda lisa



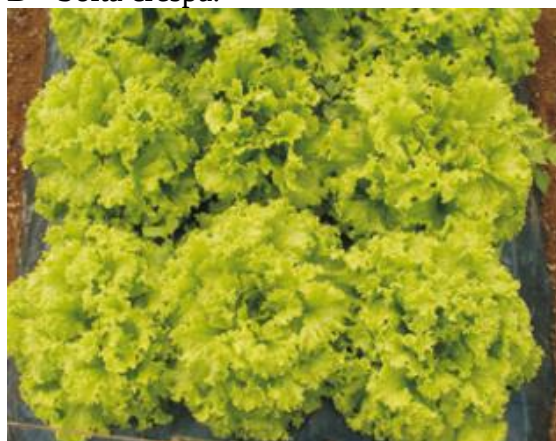
B - Repolhuda crespa.



C - Solta lisa.



D - Solta crespa.



E – Solta crespa roxa.



F - Tipo romana.



Fonte: EMBRAPA (2023).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa com diversas cores, formas e tamanhos, conhecida mundialmente por seu sabor agradável e por ser de fácil preparo e digestibilidade. Com apenas 15 a 17 calorias a cada 100 gramas, a alface contém vitaminas A e C, cálcio, ferro, fósforo e fibras, sendo uma opção nutritiva e de baixo teor calórico (Noumedem et al., 2017). Devido à presença de fibras e água proporciona sensação de saciedade, sendo ideal para aqueles que buscam consumir poucas calorias e, ao mesmo tempo, sentir saciedade. Muito rica em vitaminas, magnésio, potássio e antioxidantes, contribui para fortalecer o sistema imunológico reduzindo riscos de contração de resfriados, gripes e outros processos inflamatórios (Ismail; Mirza, 2015). Os compostos com ação antioxidante agem reagindo com os radicais livres ou reduzindo o processo de inicialização desses radicais no interior das células (Abdelkader et al., 2022; Mattosinhos et al., 2022). A presença de precursores da vitamina A, como a luteína e a xantina, a alface pode também auxiliar na prevenção de doenças oftalmológicas como catarata e degeneração macular (Das; Bhattacharjee, 2020). As fibras presentes na alface, especialmente a pectina, auxiliam na prevenção da constipação e facilitam o trânsito intestinal dos alimentos. Por ser composta de 96% de água, o consumo da alface auxilia na hidratação do corpo, diminuindo a sede e mantendo o corpo hidratado por um período de tempo mais longo.

A alface (*Lactuca sativa*) é uma hortaliça folhosa amplamente consumida em todo o mundo, que apresenta alto valor nutricional em termos de compostos bioquímicos e fibras. É conhecida por ser uma fonte de fitonutrientes incluindo clorofila, antocianinas, vitaminas e carotenoides, entre outros compostos antioxidantes (Kim et al., 2007), o que a torna ainda mais interessante no que tange às atuais tendências de consumo, já que muitas pessoas têm procurado obter uma vida mais saudável e estão mudando seus hábitos alimentares na busca por qualidade nutricional.

A composição nutricional e bioativa da alface envolve a presença de vitaminas, fitoquímicos (fenólicos e carotenóides), macro e micronutrientes cujos teores diferem dependendo da origem e variedade da espécie. Na literatura científica são relacionados pelo menos 49 compostos biotivos presentes em variedades de alfaces. São 19 tipos de vitaminas, 11 tipos de minerais, 6 tipos de carboidratos, 3 tipos de ácidos graxos e 3 tipos de proteínas e aminoácidos (Venkatesh et al., 2021).

A planta em sua totalidade é utilizada para controlar problemas no estômago, melhorando a digestão e também devido a atividade analgésica e anti-inflamatória (Sayyah et al., 2004, Kim et al., 2016). Há ainda, evidências que apontam para a existência de atividade hipoglicemiante,

antifúngica e anticancerígena e ainda propriedades antioxidantes e laxativa (Ahangarpour et al., 2014). O Quadro 1, a seguir, apresenta o perfil nutricional de diferentes variedades de alfaces.

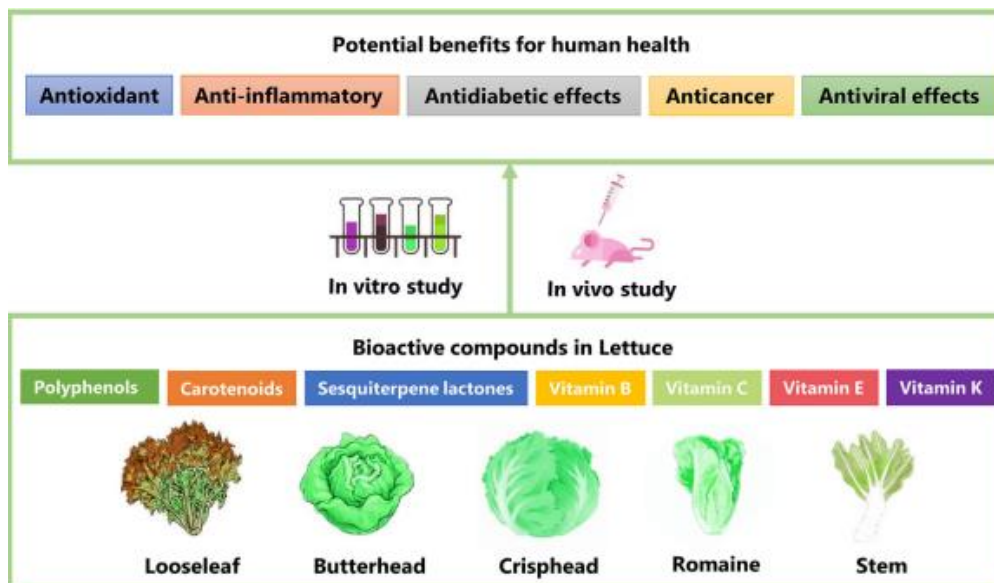
Quadro 1 – Perfil nutricional de diferentes variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)

Valor Nutricional/Variedades de alfaces		Alface americana	Alface lisa	Alface romana	Alface crespa
Vitaminas	Vitamina A	94,8 mcg	546,6 mcg	156,9 mcg	105,6 mcg
	Alfa-caroteno	0,0029 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Retinol	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	β -caroteno	0,215 mg	1,093 mg	0,314 mg	0,211 mg
	β -criptoxantina	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Licopeno	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Vitamina C	2,0 mg	2,0 mg	1,4 mg	0,9 mg
	Vitamina D	-	-	-	-
	Luteína+Zeaxantina	0,199 g	0, g	0,139 g	0,0822 g
	Vitamina K	0,0174 mg	0,0563 mg	0,0062 mg	0,0082 mg
	Tiamina	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Riboflavina	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Niacina	0,1 mg	0,2 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Vitamina B6	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Folato	0,0209 mg	0,0401 mg	0,0082 mg	0,0018 mg
	Vitamina B12	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Ácido Pantotênico	0,1 mg	0,1 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Colina	4,8 mg	4,6 mg	0,6 mg	0,06 mg
	Betaina	0,1 mg	0,1 mg	0,0 mg	0,0 mg
Minerais	Ferro	300 mcg	700 mcg	100 mcg	0,0 mcg
	Cálcio	13000 mcg	19300 mcg	2000 mcg	1700 mcg
	Fósforo	14400 mcg	18200 mcg	1800 mcg	1400 mcg
	Magnésio	5000 mcg	7200 mcg	800 mcg	600 mcg
	Sódio	7200 mcg	2800 mcg	500 mcg	1300 mcg
	Potássio	0,102 g	0,131 g	0,0148 g	0,0092 mg
	Cobre	0,0 g	0,0 g	0,0 g	0,0 g
	Zinco	100 mcg	100 mcg	100 mcg	100 mcg
	Manganês	100 mcg	100 mcg	0,0 mcg	0,0 mcg
	Flúor	-	-	-	-
Carboidratos	Selênio	100 mcg	0,3 mcg	0,0 mcg	0,0 mcg
	Carboidratos totais	2300 mg	1200 mg	200 mg	100 mg
	Fibra dietética	900 mg	600 mg	100 mg	100 mg
	Amido	0,0 mg	-	0,0 mg	0,0 mg
	Açúcar	1400 mg	500 mg	100 mg	0,0 mg
	Sacarose	36,0 mg	0,0 mg	0,0 mg	0,0 mg
	Glicose	655 mg	236 mg	24,4 mg	17,1 mg
Ácidos Graxos	Frutose	720 mg	281 mg	48,0 mg	20,4 mg
	Lipídios totais	100 mg	100 mg	-	-
	Ácido graxo ômega-3 total	37,4 mg	45,7 mg	-	-
	Ácido graxo ômega-6 total	15,1 mg	18,7 mg	-	-
Proteínas e Amino Ácidos	Lipídio poliinsaturado	100 mg	100 mg	-	-
	Proteína	600 mg	700 mg	100 mg	100 mg
	Triptofano	6,5 mg	7,2 mg	0,6 mg	0,4 mg
	Fenilalanina	16,6 mg	29,1 mg	3,9 mg	2,6 mg
Informações calóricas	Calorias	10,1 (42,3 kJ)	7,2 (30,1 kJ)	1,0 (4,2 kJ)	0,7 (2,9 kJ)
	Carboidrato	7,7 (32,2 kJ)	4,3 (18,0 kJ)	0,7 (2,9 kJ)	0,5 (2,1 kJ)
	Lipídio	0,8 (3,3 kJ)	1,0 (4,2 kJ)	0,2 (0,8 kJ)	0,1 (0,4 kJ)
	Proteína	1,6 (6,7 kJ)	1,8 (7,5 kJ)	0,2 (0,8 kJ)	0,2 (0,8 kJ)
	Alcool	0,0 (0,0 kJ)	0,0 (0,0 kJ)	0,0 (0,0 kJ)	0,0 (0,0 kJ)

Fonte: Venkatesh *et al.*, (2021).

A seguir, a figura sintetiza os benefícios gerais da alface na promoção da saúde humana:

Figura 7 – Compostos bioativos em alface, destacando os benefícios para a saúde



Fonte: Yang *et al.*, (2022).

2.2.1 Atividade Ansiolítica da Alface

Evidências atuais relacionam o estresse oxidativo como responsável por vários desequilíbrios psiquiátricos, incluindo estados depressivos, ansiedade e perda da qualidade do sono, embora os mecanismos e padrões causadores desses distúrbios não sejam ainda totalmente compreendidos (Fedoce *et al.* 2018). A inflamação em um organismo está correlacionada com surgimento e piora de sintomas psiquiátricos como ansiedade e depressão (Ismail and Mirza., 2015).

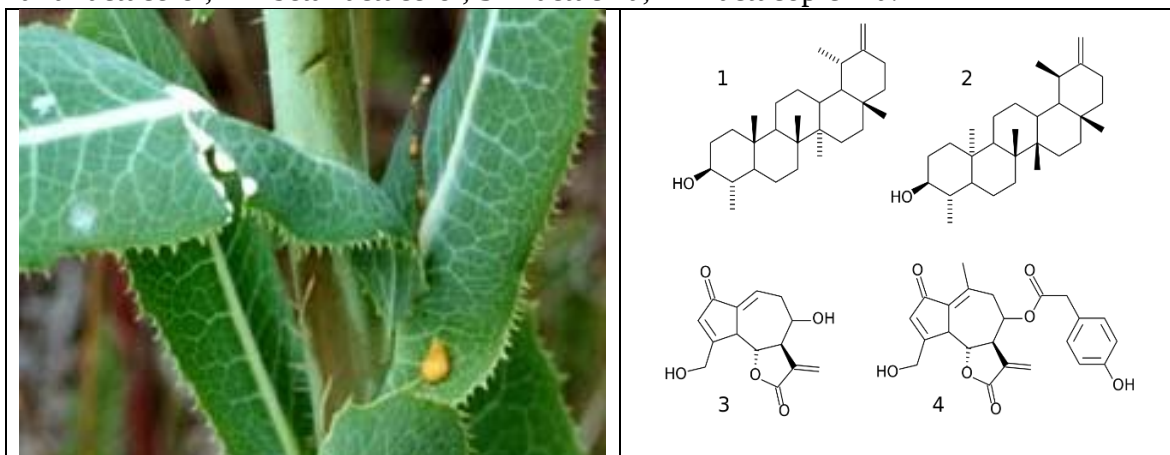
O uso de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de terapia alternativa ao uso de fármacos convencionais. Conforme a OMS, 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos nos tratamentos da saúde (Carvalho *et al.* 2021). Extratos provenientes das plantas medicinais são explorados por seus potenciais efeitos anti-inflamatórios, antidepressivos e outros (Ismail and Mirza., 2015). A Medicina Tradicional Persa (TPM) se trata de uma fonte valiosa que descreve diversas plantas medicinais com propriedades ansiolíticas e sedativas. Esse tratado descreve também ervas apropriadas para uso em mulheres gestantes que apresentam quadros de insônia e menciona um efeito hipnótico para a alface e a semente desta planta (Ghorbani *et al.*, 2013). Em um ensaio clínico randomizado, mulheres gestantes com insônia receberam cápsulas contendo 1000 mg de sementes de alface diariamente durante duas semanas, os resultados apresentaram melhora da qualidade de sono mensurado pela Escala de Avaliação

do Sono de Pittsburgh (PSQI, na sigla em inglês), um instrumento amplamente utilizado para avaliar a qualidade do sono em adultos, quanto maior a pontuação, pior a qualidade do sono. Concluiu-se então que a alface pode ser recomendada como um remédio natural seguro e eficaz no tratamento de insônia relacionado à gravidez (Pour et al., 2018)

Nesse contexto a hortaliça alface (*Lactuca sativa* L.) que, apesar de ser utilizada popularmente desde a antiguidade, no controle dos sintomas de ansiedade, insônia e outros distúrbios na saúde humana, necessita de mais estudos científicos realizados com as diferentes partes da hortaliça para comprovar e elucidar a atividade ansiolítica ou indutora do sono da espécie (Harsha; Anilakumar, 2013).

Estudos recentes indicam que a presença de lactucina e seu éster, a lactucopicrina, confere à alface propriedades calmantes, hipnóticas e soníferas podendo auxiliar a reduzir a ansiedade e melhorar a qualidade do sono (Kim et al., 2017). A lactucina junto com outros compostos com ação sedativa e analgésica estão presentes no latex secretado principalmente pelo talo de variedades de alfases em estágio avançado de maturação, sendo um composto orgânico, que em seu estado puro é encontrado na forma de cristais brancos de sabor amargo. Em conjunto com seus derivados são os principais responsáveis pelo sabor levemente amargo de plantas do gênero *Lactuca*, e algumas outras espécies da família Asteraceae. A lactucina foi observada pela primeira vez no látex da alface selvagem (*Lactuca virosa* L.), representada na Figura 13, em meados do século XIX. O látex excretado a partir de folhas e hastes danificadas de plantas com flores da alface selvagem, quando deixados a céu aberto, desidratavam em um produto gomoso e castanho conhecido como lactucário ou ópio de alface. Analgésicos, antitússicos e propriedades sedativas do ópio de alface, utilizados em toda a Europa, durante séculos, tinham sido atribuídos devido à presença de lactucina e seu éster lactucopicrina, antes mesmo de suas estruturas serem conhecidas (Barros, 2013).

Figura 8 – Lactucário escorrendo de um corte em uma planta de alface selvagem (*Lactuca virosa* L.) e princípios ativos com efeitos sedativos presentes no lactucário de variedades de alface: 1 = alfa-lactucerol; 2 = beta-lactucerol; 3 – lactucina; 4 = lactucopirina.



Fonte: Oladimeji; Kumar, (2023).

Um dos primeiros estudos com critérios científicos, voltado a investigar o efeito de compostos bioativos presentes em sementes de alface em pacientes com insônia provocada ou não por transtornos de ansiedade, mostrou que para um universo pesquisado de 60 pacientes geriátricos, o óleo de sementes de alface mostrou-se um medicamento isento de perigo, constituindo-se em um auxiliar útil para ser utilizado em protocolos de tratamento de pacientes geriátricos que sofrem de formas leves e moderadas de ansiedade, e dificuldades para dormir (Yakoot et al., 2011)

Na mesma linha de pesquisa voltada a investigar o efeito de compostos bioativos presentes em sementes de alface, foi realizado no Irã com mulheres gestantes. A pesquisa original e pioneira confirmou que o óleo obtido das sementes de alface promoveram um estado de sonolência em mulheres gestantes e, ao contrário de fármacos tradicionais, não resultaram em efeitos colaterais quando ministrados em doses adequadas (cápsulas de 1.000 mg) em 100 mulheres gestantes com idades entre 20 e 45 anos. O principal desfecho da pesquisa foi a melhoria na qualidade do sono, com a diminuição de estados de ansiedade, resultando na observação de que o óleo extraído de sementes de alface pode ser recomendado como um remédio natural seguro nas dosagens adequadas, para o tratamento da insônia relacionada à gravidez (Pour et al., 2018).

Estudos conduzidos em ratos concluíram que o extrato hidroalcolico das folhas de alface apresentou atividade ansiolítica semelhante a droga diazepam. A atividade sedativa e ansiolítica é atribuída à presença de polifenóis presentes no extrato das folhas da alface (Harsha; Anilakumar, 2013, Komaki et al., 2014).

Diferentes dosagens de extratos de semente de *Lactuca serriola* L. foram utilizados com o objetivo de avaliar o potencial anticonvulsionante, antiepilético e sedativo em modelos animais em experimentos laboratoriais controlados e os resultados obtidos demonstraram que, sob situação controlada, como a descrita, o extrato de *Lactuca serriola* L. induziu a um estado de latência nos estados epiléticos e convulsionantes induzidos e prolongamento da duração do sono, sendo que todas as dosagens testadas demonstraram um potente potencial inibitório para GABA-AT. Os resultados indicaram os potenciais efeitos ansiolíticos e antiepileptogênicos da planta e consolidou ainda mais o uso etnofarmacológico das sementes de *Lactuca serriola* L. como tratamento auxiliar em distúrbios neurológicos (Ullah et al., 2022).

A medicina tradicional persa está estabelecida sobre uma fonte valiosa de conhecimentos tradicionais de plantas medicinais utilizadas no combate à insônia, causada ou não por transtornos de ansiedade, há milhares de anos. Assim extratos de óleos de partes de plantas como a alface, são utilizadas rotineiramente no tratamento da ansiedade e insônia. Dentre eles encontra-se uma formulação intranasal de óleo de *Lactuca sativa* L., combinada com óleo de violeta e óleo de açafrão. No estudo aqui citado, 50 pacientes diagnosticados com insônia crônica primária foram submetidos a tratamento com duas gotas (duas vezes ao dia) da formulação intranasal dos óleos citados e placebo por oito semanas. O resultado do estudo mostrou uma redução positiva significativa no Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI) desde o início até o desfecho do estudo, sugerindo que a ministração da formulação intranasal multi-herbal apresenta potencial para ser utilizada como tratamento da insônia crônica primária e reduzir ou eliminar a ministração de medicamentos hipnóticos convencionais em pacientes com insônia e outros distúrbios neurais (Taherzadeh et al., 2020).

Estudos com o objetivo de promover melhoramento transgênico demonstram que a transformação de espécimes de *Lactuca sativa* L. com a utilização do gene *rol* ABC mediada com a atividade microbiana de *Agrobacterium*, induzem ao aumento significativo na quantidade de compostos fenólicos, com o consequente aumento na capacidade anticoagulante, antiinflamatória, analgésica, antioxidante e antidepressiva nas variedades de alface testadas. Assim, o desfecho do estudo destaca a importância da utilização de genes *rol* ABC mediado pela ação biológica de *Agrobacterium* no sentido de aumentar a produção de metabólitos secundários em alface e melhorar sua ação analgésica, antiinflamatória, antioxidante e suas propriedades ansiolíticas (Ismail et al., 2017).

A ansiedade é um estado fisiológico caracterizado por componentes cognitivos, somáticos, comportamentais e emocionais, havendo evidências na medicina tradicional da

eficácia da alface no tratamento de transtornos de ansiedade em humanos. O estudo ora citado, avaliou os efeitos de extrato hidroalcoólico de alface em aspectos comportamentais de ratos em laboratório, comparando os resultados com os efeitos promovidos pela ministração do diazepam. O desfecho da investigação mostrou que a administração aguda (intensa) do extrato de alface apresenta perfil ansiolítico similar à utilização do diazepam em baixas dosagens, concluindo-se pela necessidade da realização de pesquisas mais aprofundadas para esclarecer as dosagens ideais de extrato de alface no tratamento da ansiedade em humanos (Komaki et al., 2014).

Estudo semelhante também realizado com ratos em laboratório avaliou a atividade ansiolítica do extrato hidroalcoólico de alface comparada com a utilização do fármaco diazepam na dosagem de 1mg/kg de peso corporal individual dos ratos. As dosagens de extrato hidroalcoólico de alface utilizadas no experimento foram 100, 200, 300 e 400 mg/kg de peso corporal administrados via oral na população de ratos, por um período de 30 dias avaliando-se o comportamento exploratório, atividades locomotoras e atividade ansiolítica. O desfecho do estudo sugeriu que o extrato hidroalcoólico de alface, rico em polifenóis e outros metabólitos secundários, nas dosagens maiores (300 e 400 mg/kg de peso corporal) apresentam potente propriedade ansiolítica denotada pelo tempo gasto e pelo número de entradas dos ratos no campo de alimentação do experimento laboratorial (Harsha; Anilakumar, 2013).

Evidências mostram que apesar de a alface ser reconhecida popularmente por seus efeitos hipnóticos e sedativos, apenas poucos estudos documentaram seus efeitos na promoção do sono e elucidaram os mecanismos por trás desses efeitos. Este estudo investigou a atividade promotora do sono do extrato de uma variedade de alface com alto teor de lactucina (HLE), substância reconhecida como promotora do sono em modelos animais. O estudo foi conduzido com acompanhamento por eletroencefalograma das atividades neurais de grupos de pacientes induzidos ao sono pela administração de pequenas doses de pentobarbital. O grupo administrado com a dosagem de extrato de alface enriquecido com lactucina (HLE), na dosagem de 150mg/kg de peso corporal, mostrou um aumento de 47,3% no tempo de duração do sono em comparação com o grupo controle. A análise de encefalograma mostrou que o HLE aumentou significativamente o movimento ocular não rápido (NREM), onde as ondas deltas melhoraram 59,5%, resultando em aumento no tempo de sono. No modelo de excitação induzida por cafeína, o HLE diminuiu significativamente o tempo de vigília aumentado pela administração da cafeína. Como desfecho, o experimento

mostrou que o HLE aumentou o sono NREM e melhorou significativamente o comportamento do sono devido à sua ação nos receptores GABA_A. As descobertas coletivas deste estudo sugerem que o extrato hidroalcoólico de alface enriquecido com lactucina (HLE) pode ser utilizado como um novo agente para melhorar o sono em pacientes com transtorno de ansiedade e distúrbios do sono (Ahn et al., 2023).

Os efeitos ansiolíticos da alface foram testados em laboratório utilizando como modelo animal, camundongos. Os testes utilizados foram: teste de campo aberto, teste de labirinto T e teste de enterrar bolinhas de gude. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Lactuca sativa* tiveram efeito positivo sobre aspectos comportamentais dos camundongos. Foram observados aumento da atividade locomotora e tempo gasto no labirinto no grupo alimentado com extrato. Os níveis de malondialdeído (MDA) e nitrito diminuíram, os níveis de catalase e glutathione aumentaram em camundongos tratados com *Lactuca sativa*. Os dados obtidos no estudo sugerem que o extrato de *Lactuca sativa* pode proporcionar proteção significativa contra a atividade ansiolítica (Harsha; Anilakumar, 2013).

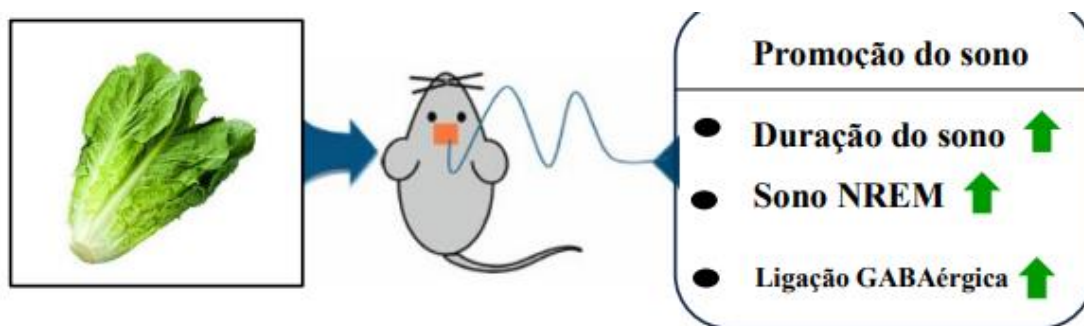
O efeito indutor do sono proporcionado por variedades de alface romana foi investigado em pacientes submetidos a dosagens leves de pentobarbital para dormir. Os extratos de sementes e folhas das variedades de alface romana, induziu a um aumento na duração do sono, tanto em dosagens baixas, como em dosagens altas. Observou-se que o extrato de alface romana variedade vermelha, apresentou menor teor de lactucina (361,50 micrograma/g) quando comparado ao extrato da variedade verde (1071,67 micrograma/g). Observou-se, também, que o extrato das sementes da alface romana apresentou maior teor de polifenóis, incluindo ácido caftarico, ácido clorogênico e ácido chicórico, quando comparado com o extrato das folhas. O estudo foi conclusivo no sentido de mostrar que a alface romana (principalmente na forma de extrato de sementes), é uma interessante e valiosa fonte de material potencializador do sono, e contém fenólicos antioxidantes que protegem do estresse oxidativo causado por distúrbios do sono (Kim et al., 2017).

Modelos animais invertebrados e vertebrados submetidos a estresse físico foram utilizados para testar o efeito do extrato hidroalcoólico de folhas de alface verde (GLE). Em *Drosophila melanogaster* o grupo que sofreu estresse vibratório apresentou redução do tempo de sono em comparação com o grupo controle, sem estresse vibratório, porém o grupo de tratamento com GLE recuperou esse tempo de sono perdido. Para os modelos vertebrados (ratos), a análise eletroencefalográfica mostrou que no grupo GLE (dosagem de 120 mg/kg de

peso corporal), a alteração no padrão de sono causada pelo estresse foi restaurada e o sono NREM (movimento ocular não rápido) aumentou 68,8%, melhorando a qualidade geral do sono. Quando tomados em conjunto, os resultados obtidos pelo estudo permitiram considerar que o GLE se liga eficazmente ao receptor GABA_A para promover melhorias na qualidade e quantidade do sono (Jo et al., 2021).

Camundongos, como modelo animal vertebrado, também foram utilizados para testar os efeitos do extrato de folhas de alface romana (RE) como potencializador do sono. A análise por HPLC mostrou que RE contém lactucopirina (0,02 mg/g de extrato), ácido clorogênico (4,05 mg/g de extrato), ácido cafeico (2,38 mg/g de extrato) e ácido chicórico (7,02 mg/g de extrato), como principais compostos fenólicos. A análise eletroencefalográfica realizada mostrou que o RE aumentou significativamente o movimento ocular não rápido (NREM), onde a onda delta foi aumentada em 40% em comparação com o grupo controle. No teste de vigília induzido por cafeína, RE diminuiu em 53% o tempo de vigília. O conjunto de resultados do estudo, mostrou que RE pode ser utilizado como agente fitoterápico no tratamento de distúrbios do sono, através da ligação ao receptor GABA_A-BZD por melhorar significativamente o aumento do comportamento do sono NREM (Hong et al., 2018).

Figura 9 – Promoção do sono em camundongos por ação das ligações GABAérgicas.



Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2019).

Grupos de ratos com sono induzido por administração de pentobarbital foram avaliados quanto a qualidade e quantidade do sono com extratos de alface romana verde contendo 1.071,7 e 199,2 mcg/g de extrato de lactucina e lactucopirina, respectivamente, substâncias que reconhecidamente melhoram a qualidade e quantidade do sono. Quando 100 mg/kg de peso corporal foram administrados por via oral, o tempo de duração do sono aumentou significativamente, o movimento ocular não rápido aumentou (NREM) e o movimento ocular rápido diminuiu (REM). O desfecho do estudo mostrou que o extrato de

alface romana promove o sono em um modelo roedor, através de um mecanismo GABAérgico (Kim et al., 2019).

Os distúrbios do sono costumam ser uma queixa comum na infância e a administração de fármacos tradicionais não são recomendados por promoverem efeitos colaterais imprevisíveis na fisiologia das crianças. Nesse contexto um estudo foi conduzido, com o objetivo de avaliar a efetividade de extrato de alface como promotora do sono em crianças. O estudo foi realizado com 67 crianças entre 3 e 6 anos de idade portadoras de distúrbios do sono. As crianças foram designadas aleatoriamente para receber topicamente, na região da testa, o óleo placebo e óleo de semente de alface durante um período de três semanas. O desfecho do estudo mostrou que as crianças do grupo intervenção (com uso tópico de óleo de alface na região da testa), melhoraram significativamente em relação ao grupo placebo, em aspectos comportamentais como ansiedade na hora de dormir, sonolência diurna excessiva e problemas na regularidade e duração do sono, concluindo-se que o uso tópico de óleo de semente de alface na testa e nas áreas temporais das crianças, pode ser considerado como um tratamento seguro e eficaz nos distúrbios do sono (Ranjibar et al., 2020).

2.2.2 Atividade Antioxidante da Alface (*Lactuca sativa* L.)

Nos últimos anos, consumidores e profissionais de vários campos, como medicina, farmácia, ciência de alimentos e a tecnologia vêm desenvolvendo um interesse crescente nas propriedades antioxidantes de frutas e vegetais, devido aos já reconhecidos benefícios à saúde demonstrados pelos compostos antioxidantes.

Em uma definição ampla, um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa ou previne a oxidação desse substrato de maneira eficaz. Os mecanismos de ação antioxidante podem incluir: remoção de O₂, eliminação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio ou sua inibição da formação de ROS/RNS, ligação de íons metálicos necessários para a catálise da geração de ROS e regulação positiva das defesas antioxidantes endógenas (Halliwell, 1996). Assim, antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar ou minimizar a reatividade de radicais livres e espécies reativas, resultantes do metabolismo normal do organismo ou vindos do meio-ambiente, por exemplo, pela poluição do ar ou com o uso de drogas. A geração de radicais livre no organismo humano é um processo fisiológico natural, e esses radicais livres

gerados atuam como mediadores à transmissão de elétrons, em inúmeras reações bioquímicas que ocorrem nos organismos (Prevedello; Comachio, 2021).

Existem três principais tipos de antioxidantes: primários, secundários e terciários (Perez; Aguilar, 2012). Os primários previnem a formação de novos radicais livres, convertendo-os em moléculas menos nocivas antes que possam reagir, ou evitam a formação de radicais livres a partir de outras moléculas. Nessa categoria estão a enzima superóxido dismutase (converte oxigênio em peróxido de hidrogênio), enzima glutathione peroxidase (converte peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos em moléculas inofensivas antes de formarem radicais livres), catalases, glutathione reductase, glutathione S transferase e proteínas que se ligam a metais (ferritina, transferrina e ceruloplasmina), limitando a disponibilidade de ferro necessária para formar o radical OH. Os antioxidantes secundários capturam radicais livres evitando a reação em cadeia (vitamina E ou alfa-tocoferol, vitamina C ou ácido ascórbico, beta-caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albumina, ubiquinol 10 e metionina). Os antioxidantes terciários reparam biomoléculas danificadas por radicais livres e são representados por enzimas de reparo de DNA e metionina sulfóxido reductase (Perez; Aguilar, 2012).

Os compostos antioxidantes são vitaminas, minerais e outras substâncias essenciais para o equilíbrio químico do organismo, e um de seus efeitos mais benéficos à saúde se traduz na sua capacidade de redução dos radicais livres presentes no organismo, pela capacidade que têm de “doar” elétrons aos radicais livres e ainda continuarem estáveis (Soares, 2002).

Os radicais livres são moléculas químicas instáveis, capazes de existência independente e que contém pelo menos um elétron não pareado (átomos com número ímpar de elétrons) o qual, pela capacidade de capturar elétrons de outras moléculas para recuperar o número par de elétrons, torna grande parte das estruturas da molécula extremamente reativas com outras moléculas formando uma cadeia de reações que pode continuar indefinidamente na presença de um substrato apropriado (Martelli; Nunes, 2014). Os radicais livres são formados por processos naturais metabólicos internos ao próprio organismo, sendo resultantes da conversão dos nutrientes em energia, mas também podem ser formados por efeitos exógenos, como exposição excessiva à insolação, ingestão de alimentos com pesticidas, ingestão de aditivos químicos, contaminação por substâncias nocivas, uso de drogas, poluição do ar e bebidas alcoólicas (Prevedello; Comachio, 2021).

A menos que algum mecanismo de defesa do organismo (antioxidantes) bloqueie esse processo contínuo de reações químicas nocivas provocadas pelo excesso de radicais livres, pode ocorrer um estado de estresse oxidativo, o qual é representado por uma situação de desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (Barbosa et al., 2010), podendo gerar danos importantes a macromoléculas e estruturas celulares, resultando no surgimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), um problema de saúde que ocorre em nível global (Prevedello; Comachio, 2021).

Dentre os vegetais promissores como fonte de compostos bioativos antioxidantes está a alface (*Lactuca sativa* L.). A alface é uma hortaliça folhosa que reconhecidamente apresenta muitos benefícios para a saúde humana. Em suas diferentes variedades e formas de consumo apresenta propriedades analgésicas, antiinflamatórias, diuréticas, indutoras do sono, ansiolíticas e antioxidantes (Ismail; Mirza, 2015; Kim et al., 2017).

As propriedades antioxidantes das variedades de alfaces cultivadas atualmente em todo o mundo, decorrem da presença nas folhas adultas e juvenis, talos e sementes de diferentes variedades de alfaces de, pelo menos, 23 compostos bioativos antioxidantes (Kim et al., 2016). Esses compostos são vitaminas (A, C e E), minerais (zinco, selênio, cobre e manganês) (Turek et al., 2013), flavonas (apiginina, chrisina, kaempferol, luteolina, miricetina, rutina, sibelina, quercetina), flavononas (fisetina, hesperidina, narigina, naringenina, taxifolina), catequinas (catequina, epicatequina, epigallocatequina galate), antocianinas (petunidina, cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina), carotenoides, betacaroteno e licopeno (Prevedello; Comachio, 2021).

Por exemplo, apenas na variedade romana da alface, estudos determinados a avaliar a composição química e a capacidade antioxidante de subvariedades da espécie detectaram a presença de ácidos orgânicos, como ácido málico, ácido cítrico, ácido cumárico, ácido glutâmico, ácido tartárico, ácido quinínico, ácido alfa-quetoglutárico, ácido succínico, ácido chiquímico e ácido malônico. Compostos fenólicos livres também foram detectados em subvariedades da alface romana, como ácido protocatechuico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, caempferol, luteolina, apigenina, floridizina e rutina. Vitamina C e folatos glutamatos e poliglutamatos também foram detectados nessa variedade de alface, além de padrões constantes de presença de carotenóides, como luteína, beta-caroteno, violaxantina e neoxantina, além de quantidades substanciais de clorofila a e clorofila b (López et al., 2014).

Os quadros 2, 3 e 4 sintetizam a composição química considerando a presença do composto (célula em verde) e ausência (célula em branco), de compostos antioxidantes em diferentes variedades de alface consumidas regularmente pelas populações humanas.

Quadro 2 – Presença de vitamina B₉ (folatos), vitamina C e vitamina E (α – tocoferol) em variedades de alfaces (*Lactuca sativa* L.) popularmente consumidas na dieta humana.

VARIEDADE DE ALFACE	FOLATOS TOTAIS	VITAMIN A C	VITAMINA E	REFERÊNCIA
Alface Crespa				USDA (2015)
Alface Batavia				NICOLLE et al. (2004)
Alface Americana				USDA (2015)
Alface Americana Baby				LI; KUBOTA (2009)
Alface Romana				USDA (2015)
Alface Romana Mini				LÓPEZ et al. (2014)
Alface Romana Baby				SAMUOLIÉNE et al. (2013)
Alface Folha Verde				USDA (2015)
Alface Continental				LLORACH et al. (2008)
Alface Green Oak				NICOLLE et al. (2004)
Alface Folha Vermelha				USDA (2015)
Alface Folha Lollo Rosso				LLORACH et al. (2008)
Alface Folha Vermelha Red Oak				NICOLLE et al. (2004)
Alface Folha Vermelha Red Oak				LLORACH et al. (2008)

Fonte: adaptado de Kim *et al.*, (2016).

Quadro 3 – Presença de carotenóides em variedades de alfaces (*Lactuca sativa* L.) popularmente consumidas na dieta humana.

[illegible]

Alface Romana Verona								BASLAM et al. (2013)
Alface Romana Baby								SAMUOLIÉNE et al. (2013)
Alface Folha Verde								USDA (2015)
Alface Green Oak								NICOLLE et al. (2004)
Alface Folha Vermelha								USDA (2015)
Alface Folha Vermelha Red Oak								NICOLLE et al. (2004)

Fonte: adaptado de Kim *et al.*, (2016).

Quadro 4 – Presença de fenólicos em variedades de alfaces (*Lactuca sativa* L.) popularmente consumidas na dieta humana.

VARIETADE DE ALFACE	ÁCIDO FENÓLICO	FLAVONÓIDES	ANTOCIANINAS	FENÓLICOS TOTAIS	REFERÊNCIA
Alface Crespa					LLORACH et al. (2008)
Alface Batavia					NICOLLE et al. (2004)
Alface Americana					NICOLLE et al. (2004)
Alface Americana Baby					LI; KUBOTA (2009)
Alface Romana					LLORACH et al. (2008)
Alface Romana Baby					SAMUOLIÉNE et al. (2013)
Alface Romana Vermelha					LIU et al. (2007)
Alface Folha Verde					WU et al. (2004)
Alface Continental					LLORACH et al. (2008)
Alface Green Oak					NICOLLE et al. (2004)
Alface Folha Verde Baby					LI et al. (2010)
Alface Folha Vermelha					ZHAO et al. (2007)
Alface Lollo Rosso					FERRERES et al. (1997)
Alface Lollo Rosso					LLORACH et al. (2008)
Alface Lollo Rosso					GARCIA-MACIAS et al. (2007)
Alface Lollo Rosso					ORDIDGE et al. (2007)
Alface Lollo Rosso					LUNA et al. (2013)
Alface Lollo Rosso					LUNA et al. (2013)
Alface Red Oak					LLORACH et al. (2008)
Alface Red Oak					NICOLLE et al. (2004)
Alface Folha Vermelha Baby					LI et al. (2010)

Fonte: adaptado de Kim *et al.*, (2016).

Embora a capacidade antioxidante da alface já esteja suficientemente comprovada cientificamente, estudos indicam que a atividade antioxidante das variedades de alface

atualmente consumidas em todo o mundo podem ser alteradas por fatores internos e externos, como compostos químicos, adubação com bioquímicos específicos, temperatura de cultivo, radiação ultravioleta, quantidade e qualidade da luz, período de colheita, pigmentação das folhas, variedade da alface, incidência de radiação ultra violeta, incidência de luminosidade, posição das folhas na planta, tipo de cultivo, presença de compostos orgânicos e tipo de substrato utilizado no cultivo. Estudos demonstram que a ação antioxidante da alface é aumentada na presença de ácido ascórbico e cisteína que agem no metabolismo da planta, aumentando seu potencial antioxidante, não sendo influenciada pela ação dos ácidos cítrico e oxálico (Altunkaya; Gokmen, 2008).

A biofortificação por adição de selênio e selenito em baixas concentrações pode favorecer o crescimento da biomassa aérea agindo como antioxidante no metabolismo da planta de alface (Ramos et al., 2010). Por outro lado, a deficiência de ferro afeta parâmetros de crescimento, conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de variedades de alface romana e lisa por provocar danos oxidativos nas variedades estudadas (Ramos et al., 2010).

A temperatura constitui outro fator exógeno de grande importância nas condições de crescimento e atividade antioxidante em alface. Alfases de seis cultivares submetidas a diferentes temperaturas durante o crescimento apresentaram resposta positiva à diferença de temperatura, resultando que em temperaturas mais baixas as variedades de alface testadas apresentaram maior atividade antioxidante e enzimáticas (Yaseen, Takacs-Hajos., 2022).

A intensidade e tipo de luz incidente nas plantas de alface durante o cultivo tem consequências significativas sobre o potencial antioxidante da alface. Por exemplo, a capacidade antioxidante das plantas de alface varia entre aquelas cultivadas em estufas plásticas com filtro para a radiação ultravioleta. O aumento da radiação ultravioleta durante o cultivo, promove incremento nos compostos antioxidantes e outros compostos bioativos de plantas de alface, como fenóis totais, flavonóides, quercetina, glicosídeos de cianidina, ácido gálico, luteolina, sendo os resultados atribuídos ao aumento da pigmentação vermelha das plantas sob influência de maior exposição à radiação ultravioleta (García-Marcías et al., 2007; Viacava et al., 2014). Resultados similares no sentido de aumento do potencial antioxidante de plantas de alface são obtidos com a exposição das plantas a fotoperíodos mais longos, com maior fluxo de fótons (Viacava et al., 2014; Sutuliené et al., 2022) e exposição a LEDs no espectro azul, vermelho e verde, sendo que a fração azul combinada com a fração vermelha em alta irradiância, têm influência significativamente melhor na fisiologia de crescimento das plantas de alface, aumentando significativamente a assimilação fotossintética, a condutância

estomática e a taxa de transpiração com efeito na atividade antioxidante (Mohamed et al., 2021).

O período de colheita e a pigmentação das folhas constituem outros fatores externos importantes a serem levados em consideração quando se considera o potencial antioxidante da alface. Quando avaliados o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de 25 cultivares de alface de folhas verdes e vermelhas submetidas a diferentes épocas de colheita, as variedades com pigmentação vermelha apresentaram maior capacidade antioxidante que as variedades com pigmentação verde, todas colhidas em duas estações contrastantes, sendo que para ambas as variedades com pigmentações vermelhas e verdes, o melhor período de colheita foi setembro (Liu et al., 2007; Sinkovic, 2023). Considerando a pigmentação das plantas de alface, resultado similar foi obtido para seis variedades de alfaces (cinco variedades com pigmentação verde e uma variedade com pigmentação vermelha). A cultivar vermelha apresentou duas vezes mais dicafeoil tartárico e ácido tartárico e 10 vezes mais ácido clorogênico que as cultivares com pigmentação verde, sendo que os fenólicos totais representaram mais de 60% da capacidade antioxidante total e o dicafeoil tartárico foi responsável por 55% (Nicolle et al., 2004; Llorach, 2008).

A posição das folhas na planta interferem no conteúdo fenólico de variedades de alfaces, sendo que a atividade antioxidante hidrofílica e lipofílica aumenta acentuadamente no sentido caule, folhas internas, folhas médias e folhas externas, sugerindo um papel protetor para os antioxidantes em plantas maduras ou mais expostas à luminosidade (Cano; Arnao, 2005; Sinkovic, 2023).

O tipo de cultivo das plantas de alface representa outro aspecto externo de grande importância na capacidade antioxidante de diferentes variedades de alface, porém com efeitos ainda não bem definidos. Padrões de flavonóides, ácido hidroxicinâmico e antocianinas não são afetados pelo tipo de cultivo, porém o rendimento das plantas proveniente de cultivo convencional são significativamente maiores que aquelas provenientes de cultivo orgânico ou biodinâmico (Heimler et al., 2012). Para plantios de alface lisa (*Lactuca sativa* var. *capitata*) nenhuma diferença foi observada no teor de compostos antioxidantes entre plantas cultivadas em sistemas orgânico e convencional sob condições de casa de vegetação (Durazzo et al., 2014). Por outro lado, para variedades de alface-crespa, o sistema de cultivo orgânico apresentou maiores valores de cinza, proteína, compostos fenólicos totais, flavonóides, compostos bioativos e atividade antioxidante, quando comparadas àquelas cultivadas em sistemas hidropônicos (Negrão et al.; 2021).

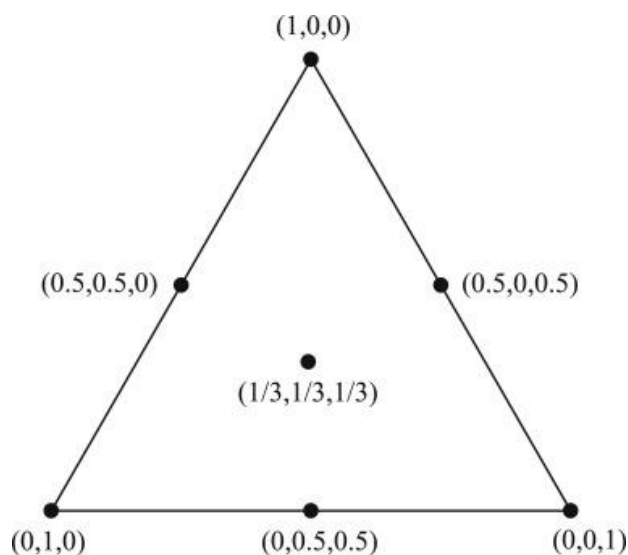
A adubação realizada com resíduos vegetais (adubação orgânica) confere melhorias na qualidade nutricional de variedades de alface lisa, com aumento no crescimento e aumento na atividade antioxidante das plantas cultivadas no sistema de adubação orgânica (Cavalheiro et al., 2021). Compostos orgânicos como a borra de café adicionada ao substrato de cultivo, promove o aumento da atividade antioxidante da alface, aumentando também os teores de compostos bioativos (Cruz et al., 2014).

2.2.3 Otimização da extração de compostos bioativos

A obtenção de bioativos presentes em plantas compreende um processo químico de extração com solventes, que é a fase que irá conter as substâncias de interesse extraídas. A escolha de um solvente extrator é um fator que deve ser levado em consideração com o intuito de se alcançar bons resultados na hora da realização de análises bioquímicas. A otimização da composição do solvente extrator é um método realizado almejando a maximização de extração dos compostos bioquímicos, que por sua vez, apresentam uma grande diversidade de moléculas orgânicas. Essa diversidade de moléculas possuem diferenças em polaridade, e em consequência, na solubilidade. Diante disso, compreende-se a importância da otimização na escolha do método de extração (De Matos et al., 2024).

O planejamento de misturas centroide-simplex é realizado com diferentes componentes (ex: água, etanol, metanol, acetona ou hexano) que delimitam a composição dos solventes extratores para combinações contendo solventes puros e misturas binárias, ternárias ou quaternárias de iguais proporções. A soma das proporções dos componentes da mistura é sempre 100 % ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$). Os extratos são analisados pela metodologia de superfícies de resposta que descreve a relação da composição do solvente extrator com a área total dos compostos presentes na amostra.

Figura 10: Modelo Simplex centroid Desing



Fonte: Jiao *et al.*, (2018).

2.3 Zebrafish como Modelo Animal na Pesquisa Científica

A utilização de animais em experimentos voltados a auxiliar na cura de enfermidades humanas remonta aos primórdios da civilização humana, proporcionando à humanidade um importante avanço no conhecimento e melhorias nos cuidados da saúde. No entanto, durante grande parte da história humana, os animais foram utilizados indiscriminadamente em experimentos controversos, pois reinava uma máxima de que não havia grandes questões morais para a utilização de animais em experimentos, pois era marcante a afirmativa do filósofo René Descartes de que estes eram seres desprovidos de espírito, portanto não havia sequer possibilidade de sentir dor (Shecaira et al., 2021).

Os registros históricos apontam que a utilização de animais surge em paralelo com as práticas utilizadas na medicina dos tempos de Hipócrates (460-377 AC) e até mesmo antes, com os pesquisadores gregos Aristóteles (384-322 AC) e Erasístrato (304-258 AC) que realizaram experimentos em animais vivos (Tabela 1).

Tabela 1- Linha do tempo da utilização de animais em pesquisas científicas.

DATA	PESQUISADOR	FOCO DA PESQUISA	ANIMAIS UTILIZADOS
300 AC	Aristóteles	Vivissecação	Desconhecido
300 AC	Erasítrato	Vivissecação	Desconhecido
300 AC	Herophilus	Vivissecação	
100 DC	Galeno	Vivissecação	Porcos e Cabras
1600	Willian Harvey	Sistema Circulatório	Desconhecido
1700	Ibn Zhur	Cirurgias	Desconhecido
1700	Stephen Hales	Cirurgias	Desconhecido
1800	Louis Pasteur	Bacteriologia	Ovelhas
1890	Ivan Pavlov	Condicionamento	Cães
1900	Fiocruz	Soroterapia	Cavalos
1910	Serge Voronoff	Transplantes	Primatas
1922	Fiocruz	Diabetes	Cães
1970	Desconhecido	Hanseníase	Tatus
1974	Rudolf Jaenisch	Transgenia	Ovelhas
1996	Instituto Roslin	Clonagem	Ovelhas
1998	Desconhecido	Cosméticos	Cães, gatos, ovelhas
2005	Fiocruz	Comissão de Ética	Animais diversos
2008	Senado Brasileiro	LEI AROUCA 11.794	Animais diversos
2009	Ministério da Ciência	da CONCEA	Animais diversos
2012	Ministério da Ciência	da RENAMA	Animais diversos

Fonte: FIOCRUZ (2023).

A maioria dos estudos e pesquisas médicas são dependentes de modelos animais para adquirir o conhecimento das causas das patologias humanas e possibilitar pesquisas com terapias inovadoras. Os animais utilizados com maior frequência em estudos biológicos são os roedores, sendo que aproximadamente 95% dos estudos são conduzidos com ratos e camundongos (Garcia et al., 2013). Recentemente, um novo vertebrado foi incluído, com sucesso, nos estudos científicos: o Zebrafish (ZF), conhecido também como peixe-zebra ou paulistinha (Figura 15). É um pequeno peixe teleósteo, com 3 a 4 cm, da espécie *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822), tropical de água doce (Kumari et al., 2024) e ocorre naturalmente em riachos das florestas indianas até o Himalaia nordeste e ocidental, ocorrendo em grandes e pequenos rios, rios de terras baixas e montanhosos, arrozais e pântanos (Arunachalam et al., 2013), não sendo uma espécie ameaçada de extinção, estando na categoria “pouco preocupante” (LC) (IUCN, 2023).

O nome *Danio* origina-se do termo bangla “dhani”, que tem como significado “do campo de arroz”, considerando que a espécie é comumente encontrada em corpos d’água onde se cultiva arroz (Arunachalam et al., 2013).

Figura 11 - *Danio rerio*, paulistinha.



Foto: Per Harald Olsen, Fonte: SCIENCE, EUREK ALERT.

O gênero *Danio* apresenta grande diversidade de padrões de pigmentos, principalmente quando se hibridiza com peixes do gênero *Devario*, como relatado anteriormente por Parichy (2007) (Figura 12). *Danio rerio* é uma espécie modelo amplamente utilizada em estudos genéticos e de desenvolvimento de vertebrados (Driever et al., 1994). O seu uso como elemento teste de laboratório foi iniciado pelo biólogo molecular norte-americano George Streisinger, da Universidade de Oregon, nas décadas de 1970 e 1980 (Streisinger et al., 1991), sendo os clones de peixe-zebra de Streisinger os pioneiros clones de vertebrados desenvolvidos com sucesso. Os principais argumentos da utilização desta espécie em estudos científicos são que eles possuem um pequeno porte, com criação de baixo custo e de fácil manutenção, alta taxa reprodutiva, genoma sequenciado e importante homologia com os mamíferos (Driever et al., 1994), além de possuírem vários desfechos comportamentais, já descritos na literatura (Cachat et al., 2011). Constituem um ótimo modelo experimental para estudos comportamentais (Egan et al., 2009; Miklósi; Andrew, 2006), toxicológicos (Souza et al., 2017; Tiedeken et al., 2005) e genéticos (Driever, 1994), para entender alguns mecanismos de diversas enfermidades humanas, bem como testar novos agentes terapêuticos (Lieschke & Currie, 2007).

Figura 12 - Diversidade dos padrões de pigmento em *Danio*.



Fonte: Parichy (2007).

Comparado a outros modelos animais mais utilizados em experimentos, como o camundongo e a drosófila, o ZF apresenta algumas vantagens, como a exemplo: embriões translúcidos provenientes de fecundação externa, grande capacidade reprodutiva, curto tempo para atingir a idade adulta, baixo custo de manutenção diária, entre outras vantagens. Outro aspecto inclui a possibilidade da sua utilização como modelo para testes dos mais diversos compostos, como drogas e tóxicos, em diversos exemplares simultaneamente (Kalueff et al., 2014).

No ramo toxicológico (Souza et al., 2017; Tiedeken et al., 2005), há um abundante material na literatura sobre os efeitos do etanol após a exposição dos embriões no desenvolvimento dos olhos, da face e do sistema nervoso central do ZF (Bilotta et al., 2002; Fernandes; Gerlai, 2009). Gerlai et al., (2000) mostraram uma impressionante semelhança no comportamento dos ZF com os seres humanos após exposição ao etanol, se mostrando de

extrema importância em estudos médicos (Patton et al., 2021), principalmente em estudos sobre ansiedade (Zenki et al., 2020).

Vale destacar também que o ZF desenvolve tumores malignos como resposta a substâncias mutagênicas. Leucemia linfoide, melanoma e hepatocarcinoma já foram relatados na literatura (Mizgirev et al., 2018) (Figura 13), confirmando que os mecanismos moleculares envolvidos são semelhantes aos dos humanos (Liu; Leach, 2011), sendo esta semelhança observada anteriormente por Gerlai et al., (2000), após a exposição ao etanol.

Figura 13 - Relatos de tumores malignos em *zebrafish* como resposta a substâncias mutagênicas registrados por Mizgirev et al., (2018).



Fonte: Mizgirev et al., (2018).

No Brasil, a prática em utilizar o *zebrafish* como modelo animal nos experimentos médicos vem equivalendo na grande quantidade de estudos publicados, iniciando principalmente nos anos 1990 (Gheno et al., 2016). Devido à sua alta capacidade de absorção de compostos inseridos na água, sua sensibilidade a químicos e seu acelerado metabolismo, destaca-se como conveniente modelo para trabalhos genéticos, teratológicos (Becker; 2008), farmacológicos (Egan et al., 2009), toxicológicos (Yang et al., 2009), neurocomportamentais (Sison; Gerlai, 2011) e para esclarecer mecanismos de diversas patologias humanas, além de testes para novos agentes terapêuticos (Silveira et al., 2012).

Diante do exposto, pelo interesse em pesquisas médicas com o ZF, cientistas da "comunidade *zebrafish*" estão bem estruturados em associações e partilham entre si as informações nas redes mundiais de informações (*The Zebrafish Model Organism Database*). A comunidade científica da América Latina, demonstrando interesse no modelo, estabeleceu o *Latin American Zebrafish Network* (LAZEN). O LAZEN promove reuniões regulares com a finalidade de debater os desafios de experimentos com o ZF, detectar as dificuldades e construir estratégias comuns para solucioná-las, o que faz acreditar que, com a organização da rede LAZEN, o número de pesquisadores deverá se elevar.

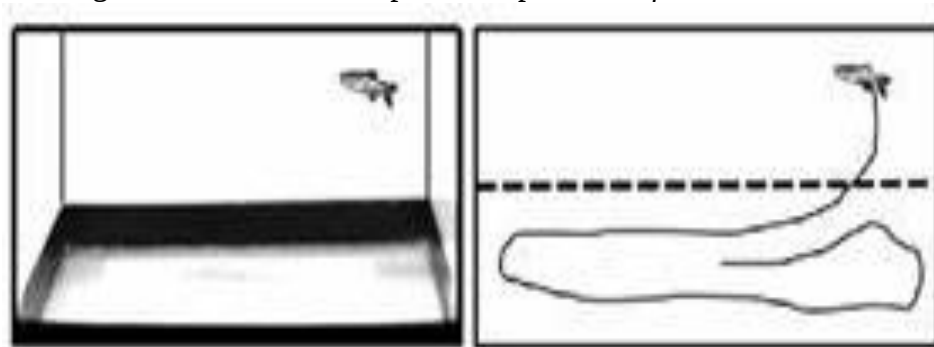
2.4 Utilização do *Zebrafish* como Modelo Comportamental

Em relação aos estudos com os distúrbios do sistema nervoso central, o *zebrafish* já é amplamente descrito pela ciência, incluindo pesquisas sobre degeneração de retina e ansiedade (Zon; Peterson., 2005). Com testes simples, rápidos e mais baratos quando comparados a outros modelos como aos roedores, o *zebrafish* se apresenta como uma poderosa ferramenta para o estudo de uma ampla variedade de doenças neuropsiquiátricas através de parâmetros comportamentais e bioquímicos (Khan et al., 2017). Sendo assim, a utilização do *zebrafish* como modelo animal tem demonstrado ser muito eficiente, uma vez que ele possui características comportamentais e sociáveis bastante peculiares (Levitasdjerbi & Appelbaum, 2017). Entre os quesitos já citados, o *zebrafish* se destaca por ser um peixe de pequeno porte, de manutenção fácil, econômico para criação, de comportamento facilmente observável e quantificável em ambiente controlado e ótima adaptabilidade em diferentes condições ambientais (Spence et al., 2008; Zang et al., 2018; Padilla & Glaberman, 2020). Por essas razões, experimentações utilizando o *zebrafish* adulto vêm se destacando em estudos da genética comportamental englobando estudos relacionados com o comportamento social, medo, depressão, estresse e ansiedade (Pancotto et al., 2018).

O tanque novo e o teste claro-escuro (LDT) destacam-se como os protocolos mais utilizados para mensurar padrões comportamentais utilizando o *zebrafish* (Kalueff et al., 2013; Mezzomo et al., 2016; Rosemberg et al., 2011). O teste comportamental tanque novo (Figura 18) é utilizado com o intuito de observar a locomoção e atividade vertical, este padrão comportamental do *zebrafish* estão ligados à ansiedade devido à alta sensibilidade a drogas ansiolíticas. Esse método de ensaio comportamental apresenta ampla utilização e validações para medicamentos ansiolíticos (Wong et al., 2010). O animal é transferido para um aquário transparente e tem seu comportamento registrado durante um intervalo de tempo para análise

posterior. Geralmente, o vídeo é analisado através de softwares que contêm diversas ferramentas para análise. Entre os mais utilizados estão o Any-Maze, o Viewpoint, TopScan, o Argus e o EthoVision (Lunkes et al., 2021).

Figura 14 – Teste de campo aberto para *zebrafish* adulto



Fonte: Adaptado de Siebel; Bonan; Silva (2015).

Inicialmente *zebrafish* tendem a ficar no fundo do tanque e conforme seus níveis de medo / ansiedade diminuem, espera-se que eles explorem as áreas médias ou superiores, que refletem a habituação ao ambiente. O aumento do tempo gasto no topo do tanque pode ser interpretado como indicação de redução da ansiedade (Agostini et al., 2020). O estresse é considerado uma resposta fisiológica do organismo e é desencadeado sempre que um indivíduo é exposto a uma situação que interfira em sua integridade ou represente alguma ameaça. Situações de estresse desencadeiam respostas fisiológicas e comportamentais, através de mecanismos de luta e fuga. Em peixes, podem ser considerados agentes estressores: alterações da temperatura, fotoperíodo (luminosidade), qualidade da água, pH, oxigênio disponível, suprimento alimentar insuficiente, predação e exposição a toxinas e sons, isolamento e perseguição. Os efeitos causados pelo estresse em *zebrafish* podem ser avaliados em análises a nível bioquímico como: níveis de cortisol endógeno, estresse oxidativo (atividade enzimáticas e formação de EROs – espécies reativas de oxigênio) e também pode-se mensurar através de análises comportamentais como locomoção e atividade vertical. As metodologias para avaliar os efeitos metabólicos do estresse já são bem descritos na literatura científica (Lunkes et al., 2021).

Destaca-se, um estudo no qual foi administrado melatonina em *zebrafish* induzidos ao estresse agudo. Neste estudo, foi observado que a melatonina foi capaz de modular os efeitos do estresse pela redução do cortisol endógeno, estímulo da atividade enzimática antioxidante e redução dos parâmetros locomotores, induzindo um estado de sono (Lunkes et al., 2021). Além disso, por possuir ação antioxidante, a administração da melatonina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo (Shin et al., 2011; Lunkes et al., 2021). Desta forma, o *zebrafish* é um modelo experimental adequado para testar os efeitos de substâncias psicoativas no

comportamento e metabolismo e assim corroborar na descoberta de possíveis novas substâncias terapêuticas.

Tabela 2 – Resumo dos desfechos comportamentais e sua significância em testes de campo aberto com o modelo experimental *zebrafish* (a = observação automática; m = observação manual; c = cálculos com base em dados registrados manualmente ou automaticamente).

Ponto Final (unidade)	Forma de Registro	Definição	Interpretação
Latência para subir à superfície do tanque (segundos)	m, a	A quantidade de tempo para cruzar pela primeira vez (pelo centro de massa do corpo) da porção inferior definida até o topo do novo tanque	Quando introduzido em um novo ambiente, o <i>zebrafish</i> mergulha naturalmente até o fundo do tanque e explora gradualmente à medida que se habitua ao aparelho de teste. A latência mais longa indica níveis mais elevados de ansiedade
Tempo gasto no topo (segundos)	m, a	Tempo total gasto na superfície do novo tanque	Uma permanência mais longa na superfície do novo tanque indica menores níveis de ansiedade.
Relação do tempo de permanência na superfície/tempo de permanência no fundo do tanque	c	É a relação entre o tempo em que o animal permanece na superfície sobre o tempo que o animal permanece no fundo do tanque	Uma baixa relação tempo na superfície/tempo no fundo indica alto nível de ansiedade
Número de idas para a superfície	m, a	É o número de cruzamentos do animal, de um ponto definido no fundo do tanque até a superfície do novo tanque	Mais entradas na superfície do tanque indicam baixos níveis de ansiedade
Relação entradas na superfície do tanque/entradas no fundo do tanque	c	É a relação entre as entradas do animal na superfície do tanque/entradas do animal no fundo do tanque	Uma baixa relação entrada na superfície/entrada no fundo indica altos níveis de ansiedade
Duração média das entradas na superfície do tanque (segundos)	c	É o tempo de permanência do animal na superfície do novo tanque, durante cada cruzamento do fundo para a superfície	Calculado como o tempo de permanência na superfície, dividido pelo número de entradas na superfície, indica que quanto

			mais curta é a duração média de entradas na superfície, maior o nível de ansiedade
Distância percorrida na superfície do tanque novo (metros)	a	É a distância total percorrida em uma porção definida da superfície do tanque	Animais com altos níveis de ansiedade tendem a percorrer maiores distâncias no fundo do tanque em detrimento da superfície do tanque
Distância percorrida na superfície/fundo do tanque	c	É a relação da distância total percorrida em uma porção definida da superfície do tanque/distância total percorrida em uma porção definida do fundo do tanque	Uma baixa relação superfície/fundo indica um alto nível de ansiedade
Distância total percorrida no novo tanque (metros)	a	É a distância total percorrida pelo animal no novo tanque	Reflete comportamentos fenotípicos de mobilidade neurológica. O <i>zebrafish</i> é bastante sensível a distúrbios locomotores quando submetidos aos efeitos sedativos de medicamentos
Número de movimentos erráticos	m, a	Refere-se a alterações bruscas e repentinas na direção de movimento do animal	Indica aumento na relação medo/ansiedade e é bastante alta em animais estressados
Velocidade média de natação (metros/segundo)	a	É a magnitude e direção da velocidade de natação do animal	Reflete aspectos motores da velocidade de natação do <i>zebrafish</i> , podendo ser aumentado ou diminuído, dependendo da natureza do comportamento do animal
Eventos de “congelamento” do animal (frequência)	m, a	O “congelamento” é a total imobilidade do animal por um período maior que 1 segundo, exceto dos olhos e guelras	Indica aumento da ansiedade e geralmente o tempo de “congelamento” é maior em animais estressados
Duração do tempo de “congelamento” (segundos)	m, a	É o tempo de duração total de todos os eventos de “congelamento”	Indica aumento na ansiedade e geralmente alto em animais estressados
Meandros (graus/metro)	a	É a relação entre o grau	Reflete aspectos locomo-

		de giro do animal no tanque <i>versus</i> a locomoção retilínea	tores da natação do <i>zebrafish</i> podendo aumentar ou diminuir, dependendo da natureza de seu comportamento
Ângulo de giro do animal no tanque (graus)	a	Refere-se ao ângulo total de giro do animal no aquário	Reflete aspectos locomotores da natação do <i>zebrafish</i> podendo aumentar ou diminuir, dependendo da natureza de seu comportamento
Velocidade angular (graus/segundos)	a	Refere-se à magnitude e direção da velocidade angular do peixe-zebra no tanque	Reflete aspectos locomotores da natação do <i>zebrafish</i> podendo aumentar ou diminuir, dependendo da natureza de seu comportamento

Fonte: Do Autor. Adaptado de Cachat *et al.*, (2011).

3 – REFERÊNCIAS

ABDELKADER B. *et al.* Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, [s. l.], v. 62, n. 11, p. 2985–3001, 5 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília, DF, 223p. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira**. Brasília, DF, 115p. 2016.

AGOSTINI, J. F. *et al.* Ceftriaxone attenuated anxiety-like behavior and enhanced brain glutamate transport in zebrafish subjected to alcohol withdrawal. ***Neurochemical research***, v. 45, p. 1526-1535, 2020.

AHANGARPOUR, A. *et al.* Progesterone and cilostazol protect mice pancreatic islets from oxidative stress induced by hydrogen peroxide, ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research***, 2014, 13, 937-944.

AHN, Y. *et al.* Heukharang lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf extract displays sleep-promoting effects through GABA_A receptor. ***Journal of Ethnopharmacology***. 314, 2023.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***. n.16, p. 678-689, 2006.

ALTUNKAYA, A.; GOKMEN, V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidante activity and total phenol contente on fresh lettuce (*Lactuca sativa* L.). ***Food Chemistry***. 107, p.1173-1179. 2008.

ARUNACHALAM, M. *et al.* (2013). Natural history of zebrafish (Danio rerio) in India. ***Zebrafish***, 10(1), 1-14.

AZEVEDO, M. L.; XAVIER, M. C.; MENEZES, C. B. Conhecimento, recomendação e uso de mindfulness por psicólogos clínicos brasileiros. ***Psicologia: Ciência e Profissão***.v.42, p.1-18, 2022.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. 23(4): 629-643. 2010.

BARROS, M. B. A. *et al.* Quality of sleep, health and well-being in a population-based study. **Revista de Saúde Pública**. 2019, 53-82.

BARROS, N. R. *Extração de lactucina das folhas e talos de alface*. Trabalho de Conclusão de Curso de Química Industrial. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis. **IMESA**, 22p. 2013.

BARROS, N. R. *Extração de Lactucina dos talos de alface*. Trabalho de Conclusão de Curso. **Fundação Educacional do Município de Assis**, SP. 35p. 2013.

BASLAM, M. *et al.* Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. **Scientia Horticulturae**. 151, 103–111. 2013.

BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 26, p. 71–80, 2008.

BELLORA, R. M. *et al.* Transtornos de ansiedade em idosos: prevalência, perfil e fatores associados em um ambulatório de psiquiatria geriátrica de Porto Alegre, Brasil. **Pan American Journal of Aging Research**. V.9, p.1-9. 2021.

BILOTTA, J. *et al.* (2002). Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. **Neurotoxicology and teratology**, 24(6), 759-766.

BRAGA, J. E. F. *et al.* Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.14, n.2, p.93-100. 2010.

CACHAT, J. M. *et al.* Video-aided analysis on zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses.

KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (eds.). Zebrafish Neurobehavioral Protocols. **Neuromethods**. 51. DOI 10.1007/978-1-60761-953-6_1, © Springer Science+Business Media, LLC, 110p. 2011.

CAMPO & NEGÓCIOS. Folhosas: em destaque no cenário nacional. **Revista Campo & Negócios on line**. Uberlândia, MG.

CANO, A.; ARNAO, M. B. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. **International Journal of Food Properties**. 8:521-528. 2005.

CARLINI, E. A. *et al.* Treatment of drug dependence whit Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.16, p.690-695, 2006.

CARVALHO, L. G.; LEITE, S. C.; COSTA, D. A. F. Principais fitoterápicos e demais medicamentos utilizados no tratamento da ansiedade e depressão. **Revista de Casos e Consultorias**. v.12, n.1, p.1-17. 2021.

CAVALHEIRO, T. R.T. *et al.* The impacto f organic fertilizer produced with vegetable residues in lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation and antioxidante activity. **Sustainability**. 13, 128. 2021.

CME INSTITUTE OF PHYSICIANS POSTGRADUATE. Benzodiazepines: revisiting clinical issues in treating anxiety disorders. **Prim Care Companion Journal Clinical Psychiatry**. 7(1), p.22-32, 2005.

CRASKE, M. G. *et al.* What is anxiety disorder? **Focus**. v.9, n.3, p.1-20, 2011.

CRUZ, R. *et al.* Antioxidant activity and bioactiva compounds of lettuce improved by expresso coffee residues. **Food Chemistry**. 145, p. 95-101. 2014.

CUETO-ESCUBEDO, J. *et al.* Zebrafish as a useful tool in the research of natural products with potential anxiolytic effects. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v.15, 2022.

DAS, R.; BHATTACHARJEE, C. Lettuce. IN: **Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables**. 2020.

DE MATOS, R. C. *et al.* Avaliações botânica, química e sazonal de folhas de Pouteria guianensis (Aubl.) e estudos pré-clínicos. 2024.

DRIEVER, W. *et al.* (1994). Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. **Trends in Genetics**, 10(5), 152-159.

DURAZZO, A. *et al.* Antioxidants in italian head lettuce (*Lactuca sativa* Var. *capitata* L.) grown in organic and conventional systems under greenhouse conditions. **Journal of Food Biochemistry**. v.38, n.1, p.56-61. 2014.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. v.112, p.4-29. 2016.

EGAN, R. J. *et al.* (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural brain research**, 205(1), 38-44.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Brasil em 50 alimentos. Brasília, DF, 364p. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Comunicado Técnico** 75. Brasília, DF. 7p. 2009.

FAGUNDES, A. M. *et al.* Transtorno de ansiedade generalizada: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 2, p. e68388-e68388, 2024.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B. & ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 32 (4). 2010.

FEDOCE, A. G. *et al.* The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? **Free Radic Res**. 52(7): 737-750. 2018.

FERNANDES, Y.; GERLAI, R. (2009). Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 33(4), 601-609.

FERRAZA, D. A. *et al.* A banalização da prescrição de psicofármacos em um ambulatório de saúde mental. **Paidéia**. v.20, n.47, p.381-390, 2010.

FERREIRA, G. G. Alface: suas aplicações na medicina doméstica e uma visão pela medicina tradicional chinesa.

FERRERES, F. *et al.* Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa* L.) changes with minimal processing and cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45, 11, 4249-4254. 1997.

FONSECA, P. A. R. Transtorno de ansiedade: uma revisão bibliográfica sobre o mal do século XXI. **Revista Contemporânea**. v.3, n.8, p.12669-12677. 2023.

FONTANA, B. D. *et al.* Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 100, p. 9-18, 2019.

GARCIA, P. *et al.* (2013). Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. **European Cells and Materials**, 26(1), 12.

GARCÍA-MACÍAS, P. *et al.* Changes in flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. 12;55(25):10168-10172. 2007.

GERLAI, R. (2012). Using zebrafish to unravel the genetics of complex brain disorders. **Behavioral neurogenetics**, 3-24.

GERLAI, R. *et al.* (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology biochemistry and behavior**, 67(4), 773-782.

GHENO, E. M. Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.

GHORBANI, A. *et al.* Potentiating effects of *Lactuca sativa* on pentobarbital-induced sleep. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 12, n. 2, p. 401, 2013.

GRIFFIN, C.E. *et al.* Benzodiazepine pharmacology na central nervous system – mediated effects. **The Ochsner Journal** 13 (2), 214-223, 2013.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**. v.38, p.3-20. 1996.

HARSHA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R. Anxiolytic property of hydro-alcohol extract of *Lactuca sativa* and its effect on behavioral activities of mice. **The Journal of Biochemistry Research**. 27(1): 37-42. 2013.

HARSHA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R. Anxiolytic property of *Lactuca sativa*, effect on anxiety behaviour induced by novel food and height. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p.532-536. 2013.

HEIMLER, D. *et al.* Conventional, organic and biodynamic farming: differences in polyphenol content and antioxidant activity of Batavia lettuce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.92. n.3, p.551-556. 2012.

HONG, K. B. *et al.* Romaine lettuce/skullcap mixture improves sleep behavior in vertebrate models. **Biological Pharmacological Bulletin**. 41, 1269-1276. 2018.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION GLOBAL BURDEN OF DISEASE. Our World in Data.org/mental-health. 2019.

ISMAIL, H. *et al.* Transformation of lettuce *rol* ABC genes: extracts show enhanced antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, antidepressant, and anticoagulant activities in rats. **Applied Biochemical Biotechnology**. 181, 1179-1198. 2017.

ISMAIL, H; MIRZA, B. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, anti-depressant and anti-coagulant properties of *Lactuca sativa* L. plant tissues and cell suspension in rats. **Complementary and Alternative Medicine**. 15:199. 2015.

IUCN RED LIST (2023). *Danio rerio*.

JO, K. *et al.* Effects of green lettuce leaf extract on sleep disturbance control in oxidative stress-induced invertebrate and vertebrate models. **Antioxidants**. 10, 970. 2021.

KALUEFF, A. V., STEWART, A. M.; GERLAI, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, 35(2), 63-75.

KALUEFF, A. V. *et al.* Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KEIMER, L. J. G. Die Gartenpflanzen im Alten Ägypten: **Ägyptologische Studien**.

KHAN, K. M. *et al.* Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.

KIM, H. D. *et al.* Sleep-inducing effect of lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties on pentobarbital-induced sleep. ***Food Science Biotechnology***. 26(3):807-814. 2017.

KIM, H. J. *et al.* Effects of methyl jasmonate on phenolics compounds and carotenoids of romane lettuce (*Lactuca sativa* L.). ***Journal of Agricultural and Chemistry***. v.55, n.25, p.10366-10372, 2007.

KIM, H. W. *et al.* Effectiveness of the sleep enhancement by green romaine lettuce (*Lactuca sativa*) in a rodent model. ***Biological Pharmacological Bulletin***. 42. 1726-1732, 2019.

KIM, M. J. *et al.* Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). ***Journal of Food Composition and Analysis***. v.49, p.19-34. 2016.

KOMAKI, A. *et al.* Anxiolytic effects of acute injection of hydro-alcoholic extract of *Lettuce* in the elevated plus-maze task in rats. ***Avicenna Journal Neuro Psychiatric Physiology***. v.2, n.5. p.1-8. 2014;1(1):e18695.

KOZASA, E. H. *et al.* Mind-body interventions for the treatment of insomnia: uma revisão. ***Revista Brasileira de Psiquiatria***, v.32, n.4, p. 437-443. 2010.

KUMARI, M. *et al.* A Novel scientific Approach: Zebrafish as an Informative in-vivo testing platform in Physiological Investigation. ***Afr. J. Bio. Sc***, v. 6, n. 4, p. 231-240, 2024.

KUREBAYASHI, L. F. S. *et al.* Chinese phytotherapy to reduce stress, anxiety and improve quality of life: randomized controlled trial. 50(5), p.853-860, 2016.

LEÃO, F. V. G. *et al.* Use of psychotropic drugs on leave due to mental disorders. ***Einstein***, 19, 1-8. 2021.

LEVINE, G. N. Meditation and cardiovascular risk reduction: a scientific statement from the American Health Association. ***Journal of American Health Association***. p. 1-57, 2017.

LEVITAN, M. N. *et al.* Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento do transtorno de ansiedade social. ***Revista Brasileira de Psiquiatria***. v.33, n.3, p.292-302. 2011.

LEVITAS-DJERBI, T.; APPELBAUM, L. Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish. ***Current opinion in neurobiology***, v. 44, p. 89-93, 2017.

LESSA, R. T. et al. A privação do sono e suas implicações na saúde humana: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 56, p. e3846-e3846, 2020.

LI, Q., KUBOTA, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental Experimental Botanic**. 67 (1), 59–64. 2009.

LI, Z. et al. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 26; 58(10):6503-6509. 2010.

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P.D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, 8(5), 353-367.

LINDQVIST, K. On the origin of cultivate lettuce. **Hereditas**. v.46, n.3-4. p.319-350, 1960.

LIU, S.; LEACH, S. D. (2011). Zebrafish models for cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 6, 71-93.

LIU, X. et al. Total phenolic content an DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **Lwt-Food Science and Technology**. 40 (3), 552–557. 2007.

LLORACH, R. et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**. 108 (3), 1028–1038. 2008.

LÓPEZ, A. et al. 2014. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. **Journal of Composition. Analysis**. 33 (1), 39–48. 2014.

LUNA, M. C. et al. Influence of nutrients solutions in an open-field soilless system on the quality characteristics and shelf life of fresh-cut red and green lettuces (*Lactuca sativa* L.) in different seasons. **Journal of Science and Food and Agriculture**. v.93, n.2, p.415-421. 2013.

LUNKES, L. C et al. Melatonin administration attenuates acute stress by inducing sleep state in zebrafish (*Danio rerio*), Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, Volume 246, 2021, 109044, ISSN 1532-0456.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**. v.66, n.3, p.1-4. 2014.

MEDEIROS, A. M. Práticas integrativas e complementares no SUS: os benefícios do Yoga e da Meditação para a saúde do corpo e da alma. **Correlatio**, v. 16, n. 2, p. 283-301, 2017.

MEZZOMO, N. J. *et al.* The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: a comparative study using the novel tank and the light–dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19-24, 2016.

MIKLÓSI, Á., & ANDREW, R. J. (2006). The zebrafish as a model for behavioral studies. **Zebrafish**, 3(2), 227-234.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília, DF, 183p. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica 31: Práticas Integrativas e Complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Brasília, DF, 154p. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sono de qualidade, mente sã, mundo feliz.

MIZGIREV, I. V. *et al.* (2018). Organism-level tumor models in zebrafish *Danio rerio*. **Acta Naturae** (англоязычная версия), 10(2 (37)), 24-29.

MOHAMED, S. J. *et al.* The impact of light spectrum and intensity on the growth, physiology, and antioxidant activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plants**. 10. 2021.

MOREIRA, A.; SCATOLIN, D. A. B. Uso do extrato de alface associado à luz intensa pulsada para o tratamento da rosácea: revisão de literatura. **Medicina e Saúde**. v1, n2, p.31-40. 2018.

NEGRÃO, L. D. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of crisphead lettuce (*Lactuca sativa* L.) of three different cultivation systems. **Food Science and Technology**. 41(2): 365-370. 2021.

NICOLLE, C. *et al.* Characterisation and variation of antioxidant micronutrientes in lettuce (*Lactuca sativa folium*). **Journal of Science Food and Agriculture**. 84 (15), 2061–2069. 2004.

NOUMEDEM, J. A. K. *et al.* *Lactuca sativa*. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. Chapter 20, p.437-449. 2017.

NUNES, B. S.; BASTOS, F. M. Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos. *Saúde e Ciência em Ação-Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde*. v.2, n.2, p.71-82. 2016.

OLADIMEJI, A. V.; KUMAR, A. B. Therapeutic profile of lettuce: leafy vegetable for moderate consumption: a review. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**. 7(2): 254-258. 2023.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* Influência da ansiedade na qualidade do sono de pessoas idosas da comunidade. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 2, p. e3494-e3494, 2024.

ORDIDGE, M. *et al.* Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Food Chemistry**. V.119. n. 3, p. 1224-1227. 2010.

PADILLA, S.; GLABERMAN, S. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. In: **An introduction to interdisciplinary toxicology**. Academic Press, 2020. p. 525-532.

PARICHY, D. M. (2007). Homology and the evolution of novelty during *Danio* adult pigment pattern development. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, 308(5), 578-590.

PATTON, E. E., ZON, L. I.; LANGENAU, D. M. (2021). Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. **Nature reviews Drug discovery**, 20(8), 611-628.

PEREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases**. 514 p. 2012.

POUR, Z. S *et al.* Double-blind randomized placebo-controlled trial on efficacy and safety of *Lactuca sativa* L. seeds on pregnancy-related insomnia. ***Journal of Ethnopharmacology***. 227, 176-180. 2018.

PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres e doenças crônicas não transmissíveis: uma revisão de literatura. ***Brazilian Journal of Development***. v.7, n.6, p.55244-55285. 2021.

RAJARAM, M. *et al.* Anti-anxiety activity of Kaahu (*Lactuca sativa* Linn.) and Nilofer (*Nymphaea alba* Linn.) in animal model. ***International Journal of Unani and Integrative Medicine***. 4(2): 05-08, 2020.

RAMOS, S. J. *et al.* Selenium biofortification and antioxidante activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. ***Plant Soil Environment***. 56(12): 584-588. 2010.

RANJIBAR, M. *et al.* Effect of topical lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed oil on childhood sleep disorders: a randomized double-blind controlled trial. ***Research Journal of Pharmacognosy***. 7(3): 47-54. 2020.

ROSEMBERG, D. B. *et al.* Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. ***PloS one***, v. 6, n. 5, p. 1–11, 2 maio 2011.

SAMUOLIENÉ, G. *et al.* LED illumination affects bioactive compounds in romaine baby leaf lettuce. ***Journal of Science Food and Agriculture***. 93 (13), 3286–3291. 2013.

SANTOS, L. N.; SALEM, E. A.; RODRIGUES JÚNIOR, O. M. Contribuição alimentar na prevenção e tratamento do transtorno de ansiedade e depressão em tempo de pandemia da COVID 19. ***Amazon Live Journal***. v.3, n.4, p.1-14, 2021.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. ***Journal of ethnopharmacology***. v. 92, n. 2-3, p. 325-329, 2004.

SCHEFFÉ, H., 1963. O Design Simplex-Centroid para Experimentos com Misturas. ***Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Metodológico)*** 25, 235-251.

SHECAIRA, T. P. *et al.* O uso de animais na pesquisa científica: um olhar para a ética. ***Colloquium Health and Education***. v.1, n.2, p.1-11. 2021.

SHIN, H. S; LEE, J.; CHOI, C. Y. Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 2, p. 221-228, 2011.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**. v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.

SINKOVIC, L.; SINKOVIC, D. K.; UGRINOVIC, K. Yield and nutritional quality of soil-cultivated crisphead lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) and corn salad (*Valerianella* spp) harvested at different growing periods. **Food Sciences and Nutritions**. v.11, n.4, p. 1755-1769. 2023.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 96, n. 2, p. 230–237, 2011.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. 15(1):71 81. 2002.

SOUSA, D. P. *et al.* A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**. 20, 18620-18660, 2015.

SOUSA, F. C. F *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios de ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(4): 642-654. 2008.

SOUZA, J. P. *et al.* (2017). Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, 186, 11-18.

SPENCE, R *et al.* (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, 83(1), 13-34.

STREISINGER, G. *et al.* (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, 291(5813), 293-296.

SUTULIENÉ, R. *et al.* Effect of light intensity on the growth and antioxidante activity of sweet basil and lettuce. ***Plants***. 11, 1709. 2022.

TAHERZADEH, Z. *et al.* Evaluation of sedative effects of an intranasal dosage form containing saffron, lettuce seeds and sweet violet in primary chronic insomnia: a randomized, double-dummy, double-blind placebo controlled clinical trial. ***Journal of Ethnopharmacology***. v.262. 2020.

TIEDEKEN, J. A., RAMSDELL, J. S.; RAMSDELL, A. F. (2005). Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). ***Neurotoxicology and teratology***, 27(5), 711-717.

TUREK, C. *et al.* Estimativa do consumo de vitaminas e minerais antioxidantes da dieta brasileira. ***Nutrición Clínica y Dietética Hospitalária***. 33(3):30-38. 2013.

ULLAH, M. I *et al.* Evaluation of the anxiolytic and anti-epileptogenic potential of *Lactuca serriola* seed using pentylenetetrazol-induced kindling in mice and metabolic profiling of its bioactive extract. ***Antioxidants***. 11(11), 2232. 2022.

USDA, 2015. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. **USDA, Washington, D.C.**

VENKATEISH, V. P. *et al.* Bioactives of *Lactuca sativa*: nutritional and clinical importance. ***Advances in health and diseases***. V. 33, p.43-64. 2021.

VIACAVA, G. E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.; ROURA, I. Determination of phytochemicals and antioxidante activity in butterhead lettuce related to leaf age and position. ***Journal of Food Biochemistry***. 38: 352-362. 2014.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. ***Química Nova***. v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VOLPE, M. L. *et al.* Bioactive compounds, antioxidant activity and growth behavior in lettuce cultivars grown under field and greenhouse conditions. ***Proceedings***. 2020. 70, 52. P. 1-6. 2021.

WIDMER, R. A influência dos fatores socioeconômicos e sociodemográficos na saúde mental e a percepção sobre a utilização de plantas medicinais no tratamento da ansiedade e depressão no Brasil. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso.

WONG, K. *et al.* Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). ***Behavioural brain research***, v. 208, n. 2, p. 450-457, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Depression and other mental disorders: Global health estimates*. 24p. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global strategies and plans of action that are scheduled to expire within one year: **WHO** traditional medicine strategy: 2014-2023. 6p. 2022.

YAKOOT, M.; HELMY, S.; FAWAL, K. Pilot study of the efficacy and safety of lettuce seed oil in patients with sleep disorders. *International Journal of General Medicine*. 4, 451-456. 2011.

YANG, L. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 245–253, set. 2009.

YANG, X. *et al.* Bioactive compounds in lettuce: highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. *Comprehensive reviews in food Science and food safety*. v.21, n.1, p. 4-45. 2022.

YASEEN, A. A.; TAKACS-HAJOS, M. Evaluation of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaf extract on bioactive compounds of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown under glasshouse environment. *Journal of King Saud University-Science*, v. 34, n. 4, p. 101916, 2022.

ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, p. 1–13, 2018.

ZENKI, K. C. *et al.* (2020). Coriandrum sativum extract prevents alarm substance-induced fear-and anxiety-like responses in adult zebrafish. *Zebrafish*, 17(2), 120-130.

ZHANG, Y. *et al.* (2022). Progress in using zebrafish as a toxicological model for traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114638.

ZHAO, X.; CAREY, E. E.; YOUNG, J. E.; WANG, W.; IWAMOTO, T. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage in phenolic compounds in lettuce. *HortScience*. 42(1): 71-76. 2007.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews Drug discovery*, v. 4, n. 1, p. 35-44, 2005.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E EFEITO ANSIOLÍTICO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

RESUMO

Doenças psiquiátricas são cada vez mais comuns na população mundial. A forma convencional para tratamento é o emprego de medicamentos da classe dos benzodiazepínicos (BZD). Porém, os efeitos colaterais são frequentemente relatados. A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça muito utilizada por sua versatilidade e também pelas suas propriedades medicinais. O presente trabalho teve como objetivo investigar os componentes bioativos e o efeito ansiolítico do extrato aquoso das folhas de alface no modelo experimental *zebrafish* (*Danio rerio*). Metodologia: Foi realizada a otimização extrativa e análises laboratoriais por diferentes metodologias, assim como foi realizado testes comportamentais com diferentes concentrações do extrato para avaliar o efeito ansiolítico de alface através do modelo experimental *zebrafish*. Resultados: extrato aquoso de alface demonstrou ser o mais eficiente na extração dos compostos bioativos e variedades de compostos com ação antioxidante. Na dose 3 (9,0g.L⁻¹) reduziu a permanência no fundo, demonstrando efeito ansiolítico em *zebrafish* e na dose 4 (12g.L⁻¹) induziu ao sono (maior tempo imóvel). Conclusão: A alface (*L. sativa* var *capitata*) é uma hortaliça rica em polifenóis e antioxidantes que exercem efeito ansiolítico.

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma manifestação fisiológica inerente ao ser humano, sendo considerada um mecanismo de proteção importante para a sobrevivência social, uma vez que mobiliza recursos físicos e psicológicos estabelecendo ações de defesa e ataque para o enfrentamento de situações desafiadoras (Lenhardtk; calvetti, 2017). Porém, em condições anormais, a ansiedade passa a ser patológica e prejudicial à qualidade de vida (Harsha & Anilakuman., 2012). A ocorrência de transtornos de ansiedade na população mundial é de 3,6%, sendo que este número aumenta para 5,6% no continente americano e 9,6% no Brasil, colocando o país, no ranking de um dos mais ansiosos do mundo (Lopes et al., 2021; IHME OUR WORLD IN DATA, 2019).

O transtorno de ansiedade é, atualmente, tratado sob abordagens distintas, mas que podem ser complementares: a psicoterapia, a farmacoterapia e a fitoterapia. A terapia cognitiva-comportamental é um tipo de psicoterapia onde o indivíduo aprende a identificar em quais aspectos seus pensamentos estão distorcidos, modificando seu comportamento de forma a controlar gradativamente tais pensamentos (Zhang et al., 2020; Teixeira, 2021). A abordagem farmacológica utiliza, por tempo limitado, derivados químicos como benzodiazepínicos, inibidores seletivos de recaptação de serotonina, antidepressivos tricíclicos e betabloqueadores (Tafet; Nemerof, 2020). A abordagem fitoterápica envolve a utilização de extratos e chás de plantas herbáceas tradicionais, de pelo menos 38 espécies, com estudos científicos de eficácia já realizados (Shahrajabian, 2021).

Nesse contexto de potencial fitoterápico, encontra-se um vegetal folhoso, amplamente utilizado na culinária mundial: a alface (*Lactuca sativa* L.). Estudos apontam para os potenciais efeitos ansiolíticos da alface em modelos animais (Harsha, Anilakumar, 2013; Hong et al., 2018; Kim, 2019; Jo et al., 2021; Motti; De falco, 2021; Ahn et al, 2023) porém, tais estudos ainda são escassos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidante e efeito ansiolítico da alface em *zebrafish*, modelo animal que tem emergido como promissor organismo em estudos de ansiedade, devido à sua eficiente resposta endócrina ao stress e sensibilidade ao tratamento com drogas e fitoterápicos (Ghidersa et al. 2021).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição da matéria-prima vegetal

As mudas de alface lisa (*L. sativa* var. *capitata*) foram adquiridas em comércio local, no município de Lavras, estado de Minas Gerais. O plantio e o cultivo foram realizados no horto medicinal da Universidade Federal de Lavras, com irrigação diária por aspersão. O tempo de cultivo foi de 45 dias, após os quais, as plantas adultas foram colhidas e encaminhadas para o Laboratório Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Lavras, onde foram higienizadas em água destilada, congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80, para posterior obtenção do extrato utilizado no experimento e realização de análises de metabólitos secundários.

2.2 Planejamento de mistura

O planejamento do experimento de mistura simplex-centróide foi realizado no software estatístico Dising-Expert 12 utilizado para explorar o efeito de diferentes solventes e suas misturas na extração de compostos bioativos e para determinar o ponto ótimo de extração da alface (*L. sativa* var. *capitata*). Na definição do experimento de simplex-centróide, os diferentes solventes são identificados em um triângulo, com componentes puros em cada extremidade, representando 100% de cada um dos solventes (água, etanol e metanol). A significância estatística desses fatores é estabelecida com análise de variância (ANOVA) e ferramentas gráficas ajudam a identificar o impacto de cada solvente nos resultados gerados.

2.3 Preparo do extrato experimental

Os extratos para a análise de compostos bioativos presentes na alface (*L. sativa* var. *capitata*) foram obtidos respeitando os resultados do planejamento de mistura. Foi utilizada a metodologia de Gonçalves & de Lima (2024), com pequenas adaptações. Cerca de 2 g de amostra, juntamente com 20 ml de H₂O destilada foram adicionados em recipientes plásticos. Após esse procedimento, as amostras foram homogeneizadas em politron e em banho ultrassônico por 1 hora. Em seguida foram transferidas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O extrato obtido foi filtrado em papel filtro e armazenado sobre refrigeração a 4°C até a realização das análises.

2.3 Perfil de Fenólicos e Fenólicos Totais

2.3.1 Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD/UV-Vis

A quantificação e identificação dos compostos fenólicos foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-DAD/UV-Vis) modelo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As separações foram realizadas usando uma coluna Shimadzu Shim-pack ODS GVPC18 (4,6 x 250 mm, 5 mm) ligada a uma pré-coluna (Shimadzu-pack ODS GVP-C18, 4,6 x 10 mm, 5µm). A fase móvel constituiu-se de 2% (v/v) de ácido acético em água deionizada (Fase móvel A) e 70:28:2 (v/v) de metanol/água/ácido acético (Fase móvel B), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ com um programa de eluição de gradiente e tempo de execução de 65 minutos. O volume de injeção foi de 20 µL. Os compostos fenólicos foram detectados a 280 nm. Os compostos fenólicos foram identificados comparando o tempo de retenção da amostra com os padrões disponíveis: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido clorogênico; (4) ácido cafeico; (5) vanilina; (6) ácido p-cumárico; (7) ácido ferúlico; (8) ácido m-cumárico; (9) ácido o-cumárico; (10) resveratrol; (11) ácido transcinâmico.

2.3.2 Identificação dos compostos fenólicos por LC-MS/MS

A caracterização dos extratos foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência - UHPLC 1290 Infinity (Agilent, Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Triplo Quadrupolo (Triple Quad LC/MS 6420) (Agilent, Santa Clara, EUA) seguindo a metodologia proposta por Barrales-Cureño et al., (2020) com modificações. As amostras foram injetadas em triplicata (Bardakci et al., 2019; Barrales-Cureño et al., 2020).

2.3.4 Quantificação de compostos fenólicos totais pela metodologia de Folin-Ciocalteu

A metodologia Folin-Ciocalteu foi utilizada para determinar o teor fenólico total (TPC), e os resultados foram expressos como mg de equivalente ácido gálico (GAE) por amostras de 100 g (Waterhouse., 2002).

2.3.5 Quantificação de compostos fenólicos totais pela metodologia de Fast Blue

Fenólicos totais foram determinados por Fast Blue através do método proposto por Medina (2011) com algumas modificações. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por cem gramas de amostra fresca. A análise foi realizada em triplicata.

2.4 Quantificação do teor total de antocianinas

O teor total de antocianinas foi estimado, espectrofotometricamente, segundo Lees e Francis (1972) adaptado por Barcia et al (2012). Para a extração dos compostos antociânicos, utilizou-se 1g de amostra de alface lisa (*Lactuca sativa var capitata*), no qual foram adicionados 25 mL de etanol acidificado pH=1 incubando-se por uma 1h à temperatura ambiente. Filtrou-se e completou-se o volume para 50 mL com etanol acidificado. Após esse procedimento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de cianidina-3- glicosídeo por 100 gramas de amostra.

2.5 Determinação da atividade antioxidante

2.5.1 Atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS⁺

O procedimento foi realizado mediante protocolo proposto por Re et al., (1999) com adaptações. Os resultados foram expressos em % de inibição do radical.

2.5.2 Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante por meio do método β -caroteno/ácido linoleico fundamenta-se na oxidação do β -caroteno (descoloração) induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, conforme método proposto por Marco (1968), com algumas alterações. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da oxidação. A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata.

2.5.3 Atividade antioxidante pelo complexo de fosfomolibdênio

A atividade antioxidante determinada pelo método do complexo fosfomolibdênio baseia-se na redução de Mo (VI) para Mo (V) pelo analito da amostra e subsequente formação de um complexo de fosfato verde Mo (V) a pH ácido conforme descrito por (Prieto; Pineda; Aguilar., 1999). Os resultados foram expressos em g equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por cem gramas da amostra fresca, com base em uma curva de calibração com diferentes

concentrações previamente conhecidas de ácido ascórbico. A análise foi realizada em triplicata.

2.5.4 Atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH foi realizada conforme o método proposto por Brand Williams et al., (1995), com adaptações, baseado na capacidade de reduzir o radical DPPH (% de inibição).

3 Teste in vivo em *Zebrafish*

Para realização do experimento comportamental em *zebrafish*, o projeto passou pela aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo 006/22, CEUA-UFLA), e foi executado seguindo rigorosamente seus preceitos. Um total de 126 *zebrafish* (*D. rerio*) adultos WT de ambos os sexos ($0,198 \pm 0,12\text{g}$), em proporção semelhante, foram obtidos do Labfish da Universidade Federal de Jataí (UFJ - Jataí, Goiás, Brasil). Os peixes foram aclimatados durante dez dias em densidade de estocagem de dois animais por litro, na ala de peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizados os procedimentos experimentais. Para a realização dos testes, os peixes foram mantidos em aquários de 3L com água constantemente aerada em sistema de recirculação, programado para filtrar 5% do volume do aquário por hora, com temperatura mantida constante em $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. O fotoperíodo foi mantido em 14 horas claro para 10 horas escuro, e os peixes foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial floculada (Alcon basic®, Alcon, Brasil). Os animais utilizados no experimento passaram pelas seguintes exposições:

Os animais foram divididos em sete grupos (18 animais em cada grupo) e submetidos aos seguintes tratamentos:

- Grupo C- Controle: animais não submetidos a estresse e sem tratamento realizado.
- Grupo CP- Controle Positivo: animais submetidos a estresse agudo e tratados com o ansiolítico diazepam ($0,16\text{ mg.L}^{-1}$).
- Grupo CN- Controle Negativo: animais submetidos a estresse agudo e sem tratamento realizado.

- Grupo 1,2,3 e 4- animais submetidos a estresse agudo e tratados com as doses (3, 6, 9 e 12 g.L⁻¹), de extrato de alface, respectivamente.

Os peixes foram eutanasiados por submersão em banho de água gelada (0–4 °C), seguindo os protocolos definidos pelo National Institute of Health (NHI, 2023) e o Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, 2023).

3.1 Protocolo de exposição ao diazepam e extrato de alface.

O extrato de alface e o diazepam foram dissolvidos em água. Antes do estresse agudo, os animais do grupo CP foram expostos a 0,16mg.L⁻¹ de diazepam por 10 min (Gebauer et al., 2011; De abreu et al., 2014). As concentrações e duração da exposição dos animais aos extratos foram baseadas em estudos prévios com outras plantas medicinais com indícios de atividade ansiolítica (Cueto-Escobedo et al., 2022) foi estabelecido exposição de 15 minutos antes do estresse agudo.

3.2 Protocolo de indução do Estresse agudo

A exposição dos animais ao estresse agudo foi realizada conforme protocolo previamente estabelecido, o qual consistiu em perseguir os animais com rede por cinco minutos, capturá-los, e depois expô-los ao ar por 1 minuto (Pavlidis et al., 2015). Imediatamente após a realização do protocolo os animais prosseguiram para os testes comportamentais.

3.3 Análise comportamental

Para avaliar as manifestações associadas à ansiedade e ao estresse, oito animais de cada grupo foram submetidos ao teste tanque novo (Siebel et al., 2015), o qual consistiu em colocar cada animal em um aquário de policarbonato transparente com dimensões de 11,5 cm × 34,5 cm × 15,5 cm e capacidade para água 3-L. Cada aquário foi preenchido com 2 L de água a uma temperatura de 28 °C, mantendo exatamente as mesmas condições experimentais. Todos os animais tiveram sua atividade natatória gravada por oito minutos sem qualquer interferência, as imagens foram gravadas por câmeras semiprofissionais. Os vídeos foram analisados individualmente por meio do software EthoVision XT® (Noldus). Os primeiros e

60 s de gravação foram descartados, considerando-os como momento de adaptação dos animais ao novo ambiente, os minutos seguintes foram analisados. Os parâmetros velocidade média em cm/s, atividade locomotora (distância de natação em cm), comportamento semelhante à ansiedade (tempo de permanência na profundidade em s), imobilidade (tempo que o animal permaneceu imóvel) foram avaliados.

4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos a partir do experimento realizado foram expressos através de médias aritméticas e desvios-padrão. Todos os dados foram testados em relação à distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal paramétrica foi utilizada a ANOVA One Way, seguida pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Para os dados com distribuição não normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's. Diferenças significativas entre as amostras foram consideradas quando o valor p foi menor que 0,05, constituindo fortes evidências contra a hipótese nula. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism 7.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento experimental de misturas

As respostas obtidas sobre as variáveis experimentais para o planejamento de mistura simplex-centróide são apresentadas na Tabelas 1, que representa a proporção da mistura como variáveis independentes e as respostas observadas.

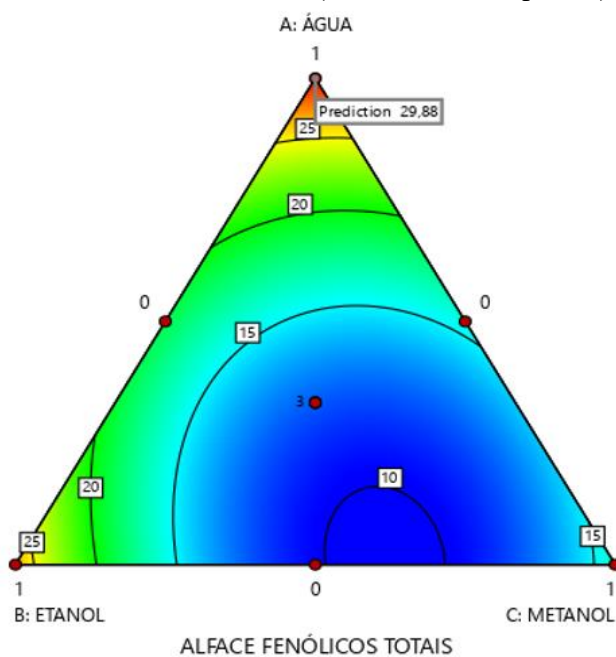
Tabela 1 – Design experimental aplicado para otimizar a extração de compostos bioativos (fenólicos totais) de alface (*L. sativa var capitata*) utilizando água (A), etanol (B) e metanol (C).

Ensaios	Variáveis independentes			Fenólicos Totais (mg GAE 100 g ⁻¹)
	A%(mL)	B%(mL)	C% (mL)	
E1	100	0	0	29,88 ± 1.58
E2	0	100	0	26,68 ± 1.02
E3	0	0	100	16,15 ± 1.63
E4	50	50	0	18,62 ± 1.26
E5	0	50	50	15,63 ± 1.07
E6	0	50	50	10,17 ± 1.62
E7	33,3	33,3	33,3	11,87 ± 1.20
E8	33,3	33,3	33,3	11,94 ± 1.03
E9	33,3	33,3	33,3	12,01 ± 1.41

Fonte: Do Autor (2024).

A ANOVA permitiu traçar gráfico de contorno para os extratos de alface (Figura 1) para cada uma das respostas avaliadas, em função das proporções de solvente.

Figura 1: Superfície de contorno ilustrando os efeitos combinados da água, etanol e metanol nos compostos fenólicos totais extraídos da alface (*L. sativa var capitata*).



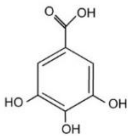
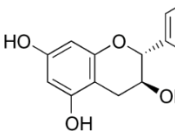
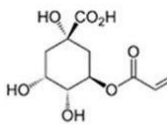
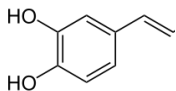
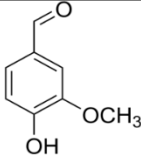
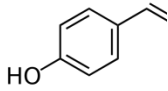
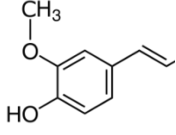
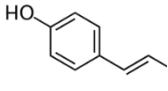
Fonte: Do autor (2024).

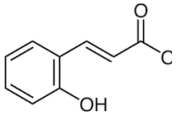
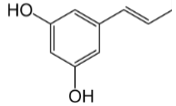
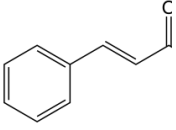
A figura 1 demonstra que a porção em vermelho é onde se encontra o maior teor de ácidos fenólicos. Quando os compostos fenólicos foram extraídos na água, o extrato de alface (*L. Sativa var. capitata*) apresentou valores mais elevados, indicando que os compostos fenólicos desta espécie são solúveis em água. Ismail and Mirza, (2015) exploraram a capacidade anti-inflamatória e antidepressiva de extratos de alface com diferentes solventes (aquoso, metanol e clorofórmio) e os resultados indicaram que o extrato aquoso de folhas exibiu maiores atividades antioxidantes e também apresentaram ações antidepressivas no SNC por meio de testes *in vivo*. Outros estudos relatam que a extração com o solvente polar (100% água) apresentou rendimentos máximos em comparação a outros solventes como o etanol ou a mistura entre os solventes (Zekkori et al., 2021). Lopez et al., (2014) mensurou a capacidade antioxidante da alface por diferentes métodos extrativos e seus resultados demonstraram que para as duas metodologias analíticas (ABTS e FRAP), a maior atividade foi obtida através dos ensaios com extrato aquoso, apontando que frações aquosas possuem uma solubilidade maior de compostos bioativos. Além disso, com as questões ambientais em pauta, a abordagem de alternativas de extração que reduzam as necessidades energéticas e reduzam impactos ao meio ambiente são fatores importantes na hora da escolha do método extrativo, sendo assim, a utilização da água, que é considerada solvente universal, se apresenta como alternativa sustentável e eficiente para realização de análises laboratoriais (Gil-Martín et al., 2022).

5.2 Perfil de fenólicos presentes em alface (*Lactuca sativa var capitata*)

Os compostos fenólicos são conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes e, portanto, por sua ação no estresse oxidativo (Flambó, 2013; Bombardi et al., 2018). Vários estudos têm sido publicados e demonstram sua ação sobre o atraso no declínio cognitivo, diminuição da morte celular neuronal e melhora da memória graças aos efeitos neuro protetores devido às propriedades antioxidante e anti-inflamatória (Spencer, 2010; Bombardi et al., 2018), assim como têm demonstrado potencial atividade ansiolítica (Marder; Paladini, 2002; Kanazawa, 2016) devido à sua afinidade e seletividade pela ação em sítios receptores benzodiazepínicos e ações em receptores GABA (Grallert, 2006). A tabela 1 abaixo demonstra o perfil de ácidos fenólicos identificados pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com seus respectivos teores e estrutura química.

Tabela 1: Perfil fenólico do extrato de *L. sativa* var *capitata* por HPLC-DAD/UV-Vis

Composto fenólico	Extrutura Química	<i>L. sativa</i> (µg.L)	Atividade biológica	Referência
Ácido gálico		nd	Antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana,	Barbosa, (2010)
Catequina		nd	Antioxidante, anti-inflamatória.	Sousa et al. (2022)
Ácido clorogênico		139,84	Antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, ansiolítico	Nascimento (2023)
Ácido cafeico		1,55	Antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena	Rosini, (2002)
Vanilina		3,35	Antioxidante, anti-inflamatória antidepressiva	Silva et al. (2023)
Ácido p-cumárico		0,52	Antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena	Motta et al. (2023)
Ácido ferúlico		nd	Antioxidante, Anticancerígena, fotoprotetor	Lima, (2023) Saija, (2000)
Ácido m-cumárico		nd	Antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena	Motta et al., (2023)

Ácido o-cumárico		0,33	Antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena	Motta et al., (2023)
Resveratrol		nd	Antioxidante, anti-inflamatória	Reis, (2023)
Ácido trans cinâmico		nd	Antioxidante	Fidelix et al. (2023)

(Valores médios de três observações; nd = não detectado). Fonte: Do Autor (2024).

Harsha et al., 2013 quantificou o perfil de fenólicos por HPLC em extrato hidroalcoólico de folhas de alface e foram identificados a presença de ácido clorogênico, vanilina, epicatequina, ácido cafeico, hidrato de rutina, ácido sinápico, quercetina e ácido p-cumárico, corroborando os resultados presentes neste estudo. O ácido clorogênico (ACG) foi o constituinte majoritário, assim como no estudo realizado por López et al (2014) o qual identificou o ACG em maior proporção, além da presença do ácido cafeico e p-cumárico. O ACG é um polifenol bioativo que está presente em uma grande diversidade de alimentos, como o café verde e torrado, frutas cítricas e vegetais verdes (Lu et al., 2020). São atribuídas ação antioxidante, hipoglicemiante, hipolipídica e antiinflamatória, podendo ser empregado na prevenção e tratamento de diferentes tipos de patologias (Bouayed et al., 2007). Em estudos utilizando modelos animais de ansiedade, o ACG foi capaz de exercer ação ansiolítica semelhante a droga diazepam, agindo como um agonista dos receptores benzodiazepínicos (Bouayed et al., 2007). Além disso, foram capazes de reduzir a ansiedade em ratos diabéticos (Adolpho et al., 2012) em testes comportamentais. A vanilina é o principal fenólico presente na baunilha e por fornecer um dos aromas naturais mais importantes, é bastante requisitado pela indústria alimentícia, de bebidas, farmacêutica e cosmética. Além disso, estudos científicos apontam evidências sobre suas atividades biológicas como as propriedades antioxidantes, e antidepressivas (Olatunde et al., 2022). O ácido p-cumárico é geralmente encontrado nos vegetais como espinafre, beterraba e em cereais. Possui atividade biológica considerável como antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (Motta et al., 2023). Ao longo das últimas décadas, estudos epidemiológicos forneceram evidências robustas sobre a associação entre a ingestão regular de polifenóis e a diminuição da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o câncer, obesidade, diabetes e doenças

cardiovasculares (Cory et al., 2018). Sendo assim, a adoção de uma dieta adequada é decisiva para o equilíbrio entre a saúde física e mental, uma vez que DCNT são fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas relacionados a ansiedade e depressão e as doenças neurodegenerativas. A tabela 2 demonstra o perfil de fenólicos identificados por UHPLC MS/MS.

Tabela 2. Perfil fenólico do extrato de *L. sativa* por UHPLC MS/MS

Composto	Tempo de retenção (min)	Etanol
Crisofanol	0,88	+
Crisina	0,99	+
Ácido cafeico	1,10	+
(+)-Ácido ferúlico	1,20	+
Ácido o-cumárico	1,26	+
Ácido p-cumárico	1,53	+
Ácido clorogênico	2,01	+
Ácido sinapínico	2,15	+
Pirogalol	2,25	+
Ácido glutâmico	2,70	+
Ácido málico	2,80	+
L-fenilalanina	6,25	+
Ácido rosmarinico	10,60	+
Ácido elágico	11,34	traço
Keracyanin	11,40	+
Quercetina 3-glicosídeo	12,20	+
Quercetina 3D-Galactosídeo	12,30	+
Isoorientin	12,57	traço
Kuromanina	12,98	+

Luteolina 7,O-Glicosídeo	13,20	+
Apenigin-7-O-glucoside	14,25	+
Cynaroside	14,39	+
Ácido 4-hidroxibenzoico	14,76	traço
Luteolina	14,87	+
Ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPAA)	11,48	+
Miricetina	11,70	+
Kaempferol	14,93	+

Fonte: Do Autor (2024).

Ácido clorogênico; ácido cafeico; ácido p-cumárico; e ácido o-cumárico, foram identificados pela análise feita em UHPLC MS/MS (tabela 2), assim como em HPLC. Atualmente, comparado com o HPLC, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) é considerado o método mais avançado para identificar compostos com baixo e alto peso molecular (Wei et al., 2022). A determinação destes compostos por cromatografia líquida requer alta resolução (UHPLC) e rápido tempo de análise. Dessa forma, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência resulta dados superiores ao HPLC (Da Silva et al., 2022; Wei et al., 2022). Outros compostos de importância biológica também foram identificados: a crisina, apigenina, quercetina, luteolina e kaempferol são fenóis recorrentes em *Passiflora incarnata* e em *Matricaria chamomilla*, plantas com ação ansiolítica comprovadas cientificamente (Nicolucci., 2019). Especificamente, o composto crisina apresenta efeitos depressivos do SNC, atuando como agonista do receptor benzodiazepínico (Diniz et al., 2015). De modo semelhante, a apigenina apresentou efeito ansiolítico com afinidade pelo sítio benzodiazepínico e foi observado em doses mais elevadas efeito sedativo em camundongos (Nicolucci., 2019). A quercetina é um flavonol de grande importância biológica, considerada um fitoterápico pela ANVISA. A sua atuação como antidepressivo e atividade ansiolítica têm despertado grande interesse em pesquisas pois apresenta ações farmacológicas semelhantes de medicamentos utilizados no tratamento de doenças psiquiátricas, ou seja, ação GABAérgica e benzodiazepínica (Grallert, 2006). A quercetina age também reduzindo a resposta neuroinflamatória (Bombardi et al., 2018). Além

disso, a ação antioxidante dos flavonóides, exercem bloqueio da toxicidade neuronal, reduzindo assim o estresse oxidativo, atuando como neuroprotetores (Spencer, 2010; Bombardi et al., 2018). Fedoce et al., 2018 descreveu que doenças relacionadas a distúrbios de ansiedade estão correlacionadas a baixa taxa de compostos que atuam como antioxidantes no sistema orgânico, o que acelera o processo de oxidação das proteínas, lipídios e ácidos nucleicos no interior das células. Ações neurológicas associadas a hortaliça alface é outra característica de importância desta espécie. Estudos demonstram que extratos de alface têm influência na mortalidade de células neuronais (Venkatesh et al., 2021), devido a grande diversidade de compostos bioativos que exercem funções biológicas e antioxidantes de importância no organismo, atenuando sintomas da ansiedade e depressão (Fedoce et al., 2018). Na tabela 3 abaixo podemos visualizar os resultados obtidos de fenólicos totais e atividade antioxidante por diferentes metodologias presente no extrato aquoso de alface (*L. sativa*. var. *capitata*)

Tabela 3- Fenólicos totais e atividade antioxidante por diferentes metodologias presente no extrato aquoso de alface (*L. sativa*. var. *capitata*)

Determinação	Extrato aquoso <i>L. sativa</i>
Folin-Ciocalteu (mg GAE 100 g ⁻¹)	46,31 ± 8,93
Fast Blue (mg GAE 100 g ⁻¹)	205,19 ± 0,12
Antocianinas (mg/100 g)	2,85 ± 1,02
ABTS ⁺ (% inibição)	48,14 ± 2,61
β-caroteno/ácido linoleico (% inibição)	32,81 ± 1,80
Complexo de fosfomolibdênio (g EAA 100 g ⁻¹)	21,13 ± 2,80
DPPH [•] (% inibição)	20,77 ± 0,52

Fonte: Do Autor (2024).

Processos oxidativos em excesso são prejudiciais ao organismo no geral, porém, o Sistema Nervoso Central (SNC) é especialmente afetado. Fatores como capacidade regenerativa limitada das células neuronais, a alta sensibilidade a oxidação e o metabolismo intrínseco dos neurônios o tornam mais sensíveis aos danos provenientes da oxidação (Fedoce et al., 2018). O cérebro humano representa apenas 2% do peso corporal total, e surpreendentemente, é responsável por 20% do consumo total de oxigênio do organismo (Friedman et al., 2011). Sendo assim, compostos antioxidantes provenientes da dieta pode ser um fator protetor para as doenças psiquiátricas, especialmente a ansiedade e depressão,

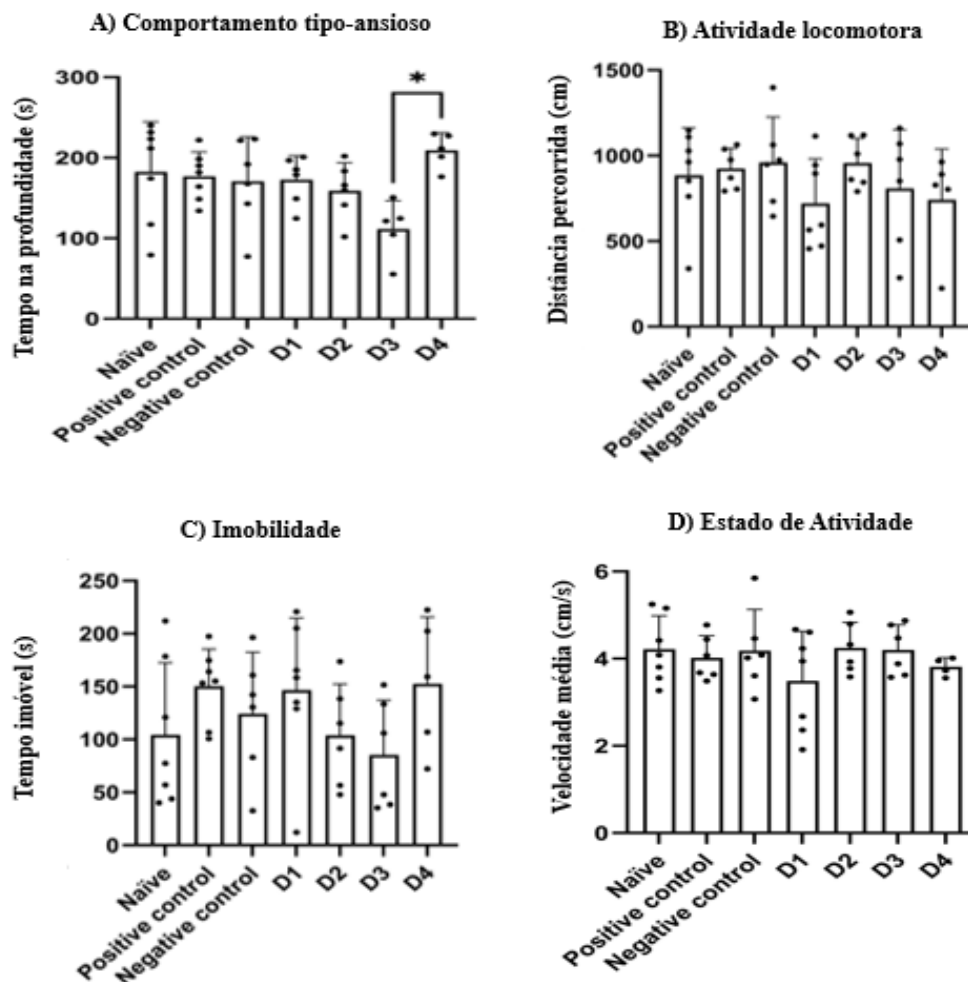
devido a redução de danos oxidativos (Yang et al., 2007). Nesse contexto, a hortaliça alface (*L. sativa* L.), destaca-se como um recurso promissor no tratamento de transtornos psiquiátricos, uma vez que os ativos presentes nesse vegetal agem no SNC potencializando neurotransmissores GABA, reduzindo a transmissão dos impulsos nervosos e conduzindo a um estado de relaxamento (Sarris et al., 2011; Ahn et al., 2023).

Na determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, os valores obtidos foram de $46,31 \pm 8,93$ mg EAG 100 g^{-1} . Melo (2006) e colaboradores analisaram a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos de hortaliças usualmente consumidas como a alface-crespa e lisa, os teores de compostos fenólicos foram de 22,6 e 13,85 mg.100 g⁻¹, respectivamente. Outro estudo avaliou os fenólicos totais em espécies de alface e os resultados variaram de 8,4 a 12,9 mg.100 g⁻¹ (Nicolle et al., 2004). Arbos et al (2010) quantificou o teor de fenólicos em alface orgânica que apresentou um valor de $108,72 \pm 2,34$ mg EAG. 100 g⁻¹. Outro trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de alface cultivada com fertilizantes orgânicos e foi observado que houve melhoria na qualidade nutricional e aumento de teor de antioxidantes pelos métodos folin (8,89 mg EAG/g) e ABTS (41,09 mg TEAC/g) (Cavalheiro et al., 2020). Tais resultados demonstram que a atividade antioxidante e o teor dos compostos fenólicos variam de acordo com os fatores externos como variabilidade genética, ambientais, tipo de cultivo, idade e variedade da planta (Kahkonen et al., 1999; Kaur; Kapoor, 2001; Koleva et al., 2002; Melo et al., 2006). As análises laboratoriais desenvolvidas confirmam a presença de grande variedade de compostos bioativos de relevância na alface (*L. Sativa* L.) e a diversidade de classes químicas (fenóis, flavonóides, terpenoides) são responsáveis pelos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante, neuro protetiva e hipnótica (Noumedem et al., 2017). Desse modo, o consumo regular de hortaliças como a alface (*L. Sativa* L.), podem proporcionar melhorias para sintomas específicos relacionados à ansiedade e depressão (Batsikoura et al., 2021).

5.3 Análise Comportamental

A utilização de filmagens e de softwares apropriados é importante ferramenta para identificar padrões no comportamento do *zebrafish*. Elas possuem a vantagem de quantificar parâmetros da atividade natatória que de forma manual, seriam altamente subjetivos. Sendo assim, a análise feita através de vídeos é um método para medições rápidas, precisas e consistentes de padrões comportamentais relacionadas à ansiedade (Cachat et al., 2011).

A Figura 2 representa os resultados da análise comportamental tanque novo em *zebrafish* submetidos ao estresse agudo (Controle negativo), tratados com diazepam (Controle positivo) e extrato aquoso de alface (dose 1,2,3,4).



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: (A) Comportamento tipo-ansioso (permanência na profundidade em s) (B) Atividade locomotor (distância percorrida em cm). (C) Estado de atividade (velocidade média em cm/s). (D) Imobilidade (tempo imóvel em s). (A) (D) Kruskal-wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's; (B)(C) ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. C: grupo controle. (Figura criada com auxílio do software GraphPad Prism versão 7.01)

Os resultados das variáveis comportamentais associadas à atividade locomotora (distância percorrida) e ao estado de atividade (média de velocidade) demonstram um perfil de animais que, quando colocados em um novo ambiente, assumem um comportamento inato de fuga, representado inicialmente a um maior tempo de permanência na profundidade, seguido pela exploração vertical, movimentos erráticos e episódios de congelamento ou

freezing (Kysil et al., 2017). Dessa forma, independentemente de haver uma fonte estressora ou não, um animal colocado em um novo ambiente tende a ter determinado padrão de comportamento até a adaptação ao novo meio. Essa hipótese justifica não terem sido encontrados diferenças estatisticamente significativas nesses parâmetros entre os grupos. Os animais expostos ao estresse agudo com posterior exposição ao extrato de alface nas doses 3 (9,0g.L⁻¹) apresentou um menor tempo de permanência no fundo (comportamento tipo-ansioso) do que os demais tratamentos e diferença significativamente menor que o D4 (12 g.L⁻¹). O comportamento tipo ansioso no *zebrafish* é caracterizado pela permanência do animal na profundidade do aquário (Cachat et al., 2011). A administração da dose 3 (9,0g.L⁻¹) do extrato de alface (*L. sativa var capitata*) foi capaz de diminuir sintomas de ansiedade no animal, uma vez que o *zebrafish* permaneceu menos tempo na profundidade. Além disso, obteve um aumento da atividade exploratória, passando maior tempo na superfície/topo, embasando o efeito ansiolítico. Foi observado que na dose 4 (12g.L⁻¹) *zebrafish* permaneceu um maior tempo no fundo, apresentando diferenças significativas em relação aos demais tratamentos. Isso indica que a administração da dose mais alta induziu o animal a assumir o estado de sono, o que pode ser comprovado pelo tempo que o animal permaneceu imóvel (figura c). No presente estudo, o diazepam não foi capaz de promover efeito de diminuição dos parâmetros relacionados à ansiedade. Ainda que existam estudos que demonstram os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, em *zebrafish*, há também trabalhos indicando que o efeito do diazepam causou pouco ou nenhuma alteração a nível comportamental no animal (Bencan et al., 2009). Sendo assim, a administração de drogas químicas pode apresentar resultados inconsistentes dependendo das variáveis envolvidas no estudo (Bencan et al., 2009; Lunkes et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

O extrato de alface (*L. sativa var capitata*) possui um perfil rico em compostos fenólicos e antioxidantes exercendo ações neuroprotetivas e ansiolíticas no SNC. O extrato aquoso demonstrou ser o mais eficiente na extração dos compostos bioativos de interesse. No modelo *zebrafish*, a dose 3 (9,0 g.L⁻¹) do extrato reduziu a permanência do peixe na profundidade, indicando redução dos sintomas de medo e ansiedade. A dose 4 (12 g.L⁻¹) foi efetiva na indução do estado de sono, comprovado pelo parâmetro imobilidade (tempo que o animal permaneceu imóvel). O extrato aquoso de *L. sativa* possui polifenóis e antioxidantes que exercem efeito ansiolítico.

7 – REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L. O. *et al.* Derivados dos ácidos clorogênico, cafeico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática. 2012.

AHN, Y. *et al.* Heukharang lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf extract displays sleep-promoting effects through GABAA receptor. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 314, p. 116602, 2023.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 94, de 6 de novembro de 2003.

BASS, S.L. & GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish, *Behav. Brain Res.* 186,107–117 (2008).

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. v.19, n. 2, p. 93-106. 2017.

BARDAKCI, H. *et al.* A comparative investigation on phenolic composition, antioxidant and antimicrobial potentials of *Salvia heldreichiana* Boiss. ex Benth extracts. *South African Journal of Botany*, [s. l.], v. 125, p. 72–80, 2019.

BARRALES-CUREÑO, H. J. *et al.* Metabolomic data of phenolic compounds from *Acer negundo* extracts. *Data in Brief*, [s. l.], v. 30, 2020.

BATSIKOURA, M. *et al.* Anxiety status and coping strategies in association with sociodemographic factors, dietary and lifestyle habits in Greece. *Clinical practice and epidemiology in mental health: CP & EMH*, v. 17, p. 152, 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BENCAN, Z., SLEDGE, D., LEVIN, E.D., 2009. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 75–80.

BOMBARDI D, A. C. *et al.* Literature Evidence and ARRIVE Assessment on Neuroprotective Effects of Flavonols in Neurodegenerative Diseases` Models. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets.*, v. 17, n. 1, 2018

BOUAYED, J. *et al.* Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. ***Journal of the Neurological Sciences***.v.262, n.1-2. P. 77-84. 2007.

CACHAT, J. M. *et al.* Video-aided analysis of zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses. Zebrafish neurobehavioral protocols, p. 1-14, 2011.

CASSAR, S. *et al.* Use of zebrafish in drug discovery toxicology. ***Chemical Research of Toxicology***. 33, p.95-118. 2020.

CAVALHEIRO, T. *et al.* The impact of organic fertilizer produced with vegetable residues in lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation and antioxidant activity. ***Sustainability***, v. 13, n. 1, p. 128, 2020.

CHAHARDEHI, A. M. *et al.* Zebrafish, a biological model for pharmaceutical research for the management of anxiety. ***Molecular Biology Reports***. 50: 3863-3872. 2023.

COLLIER, A. D.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRÍA, D. J. Zebrafish models of anxiety-like behaviors. In: Kalueff, A. (eds) The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish. ***Springer, Cham***.

CORY, S. P. *et al.* The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. ***Front Nutr***, 5 (2018), p. 87, 10.3389/fnut.2018.00087

CUETO-ESCOBEDO, J. *et al.* Zebrafish as a useful tool in the research of natural products with potential anxiolytic effects. ***Frontiers in behavioral neuroscience***, v. 15, p. 795285, 2022.

DA SILVA, R. F. *et al.* Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. ***Microchemical Journal***. Elsevier Inc.,1 abr. 2022

DE ABREU, M. S. *et al.* Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. ***PLos One***. v.9, n.7, p.1-5. 2014.

DINIZ, T. C. *et al.* The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy. ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, v. 2015, Article ID 171756, 9f, 2015.

FEDOCE, A. G. *et al.* The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? ***Free radical research***, v. 52, n. 7, p. 737-750, 2018.

FLAMBÓ, D.F.A.L.P. Atividades biológicas dos flavonoides: Atividade antimicrobiana. p. 1-53. 2013.

FIDELIX, M. S. P. *et al.* Efeito do ácido trans-cinâmico na transdiferenciação epitelial-mesenquimal em células do epitélio alveolar. 2023.

GEBAUER, D. L. *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior***. v.99, n.3, p.480-486, 2011.

GIL-MARTÍN, E. *et al.* Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. ***Food Chemistry***, v. 378, p. 131918, 2022.

GONÇALVES, T. M., & DE LIMA YAMAGUCHI, K. K. (2024). O Extrato Aquoso de flores de Bela Emília (*Plumbago auriculata*) como indicador natural de pH no Ensino Investigativo de Química. ***Revista JRG de Estudos Acadêmicos***, 7(14), e141010.

GUIDERSA, M. *et al.* Meta-analysis on some plant extracts benefits on neuropsychiatric disorders models studied in zebrafish. ***Academy of Romanian Scientists Annals***. v.10, n.2. p.79-93. 2021.

GRALLERT, S. R. M. Flavona e análogos como radioligantes para imageamento cerebral. Síntese, marcação com radioiodo e estudo in vivo frente a sítios receptores benzodiazepínicos. 2006, 183f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - USP, São Paulo, 2006.

HACKE, A. C. M. *et al.* Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 260, p. 113036, 2020.

HARSHA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R. Anxiolytic property of *Lactuca sativa*, effect on anxiety behaviour induced by novel food and height. ***Asian Pacific journal of tropical medicine***, v. 6, n. 7, p. 532-536, 2013.

HONG, K. B. *et al.* Romaine lettuce/skullcap mixture improves sleep behavior in vertebrate models. ***Biological Pharmacological Bulletin***. 41, 1269-1276. 2018.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION GLOBAL BURDEN OF DISEASE. ***Our World in Data.org/mental-health***. 2019.

IACUC POLICY: Use of zebrafish for research and teaching. **Texas Tech University Health Sciences Center**. 2p. 2023.

ISMAIL, H.; MIRZA, B. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, anti-depressant and anti-coagulant properties of *Lactuca sativa* (CV. Grand Rapids) plant tissues and cell suspension in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 1-7, 2015.

JO, K. *et al.* Effects of green lettuce leaf extract on sleep disturbance control in oxidative stress-induced invertebrate and vertebrate models. **Antioxidants**. 10, 970. 2021.

JOHNSON, A. *et al.* Examining behavioural test sensitivity and locomotor proxies of anxiety-like behaviour in zebrafish. **Scientific Reports**. 13:3768. 2023.

KATOCH, S.; PATIAL, V. Zebrafish: an emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**. 41: 33-51. 2020.

KANAZAWA; SALES, L. K. Efeito da quercetina em modelos animais de mania. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, 2016, 90f.

KYSIL E. V. *et al.* Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using ConflictBased Novelty Tests Elana, **Zebrafish**. 14 (2017) 1–12.

KIM, H. W. *et al.* Effectiveness of the sleep enhancement by green romaine lettuce (*Lactuca sativa*) in a rodent model. **Biological Pharmacological Bulletin**. 42. 1726-1732, 2019.

LENHARDTK, G.; CALVETTI, P. U. Quando a ansiedade vira doença? Como tratar transtornos ansiosos sob a perspectiva cognitivo-comportamental. **Aletheia**. v.50, n.1-2, p.11-122, 2017.

LIMA, J. M. Revestimentos de gelatina extraídos de pele da tilápia (*Oreochromis niloticus*) enriquecidos com ácido ferúlico na qualidade de filés de atum (*Thunnus albacares*). 2023.

LOPES, A. B. *et al.* Transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 35, p. e8773-e8773, 2021.

LÓPEZ, A. *et al.* Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. ***Journal of Food Composition and Analysis***, v. 33, n. 1, p. 39-48, 2014.

LU, H. *et al.* Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. ***Comprehensive reviews in food science and food safety***, v. 19, n. 6, p. 3130-3158, 2020.

MANUAL MSD VERSÃO SAÚDE PARA A FAMÍLIA. Transtorno de Ansiedade Generalizada.

MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. ***Journal of the American Oil Chemists' Society*** volume, v. 45, p. 594–598, 1968.

MARDER, M.; PALADINI, A.C. GABA_(A)-receptor ligands of flavonoid structure. ***Current Topics on Medicinal Chemistry***, v. 2, n. 8, p. 853-867, 2002.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. ***Journal of Functional Foods***, v. 3, n. 2, p. 79–87, abr. 2011.

MELO, E. A. *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. ***Food Science and Technology***, v. 26, p. 639-644, 2006.

MOTTA, L. F. *et al.* Análise Farmacocinética e Toxicológica in silico para Derivados do Ácido Cinâmico. In: ***OPEN SCIENCE RESEARCH X***. Editora Científica Digital, 2023. p. 749-765.

MOTTI, R.; DE FALCO, B. Traditional herbal remedies used for managing anxiety and insomnia in Italy: an ethnopharmacological overview. ***Horticulturae***. 7(12), p.1-32. 2021.

NASCIMENTO, A. C. A. Nanocompósitos na forma de fibras poliméricas à base de policaprolactona com hidrotalcita imobilizada para a adsorção de ácido clorogênico. 2023.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Guidelines for animal study proposals using zebrafish in the NHI intramural research program. 4p. 2023.

NOUMEDEM, J. A. K. *et al.* Lactuca sativa. In: **Medicinal spices and vegetables from Africa**. Academic Press, 2017. p. 437-449.

NICOLLE, C. *et al.* Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2061-2069, 2004.

NICOLUCCI, C. Avaliação Funcional da Quercetina como Potencial Agente Psicoterapêutico em Modelo Animal de Exposição Aguda por Cocaina. 2019.

OLATUNDE *et al.* (2022) Vanillin: a food additive with multiple biological activities. **European Journal Of Medicinal Chemistry Reports**.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v.60, p.121-131. 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**. [s.l: s.n.].

RANJBAR, M. *et al.* Effect of tropical lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed oil on childhood sleep disorders: a randomized double-blind controlled trial. **Research Journal of Pharmacognosy**. 7(3): 47-54. 2020.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REIS, L. Avaliação da atividade antitumoral de compostos análogos do resveratrol. 2023.

SARRIS, J. *et al.* Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. **European neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 841-860, 2011.

SHAHRAJABIAN, M. H. *et al.* Traditional herbal medicines to overcome stress, anxiety and improve mental health in outbreaks of human coronaviruses. **Phytotherapy Research**. 35: 1237-1247. 2021.

SPENCER, J. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, v. 104, n. 3, p. S40-S47, 2010.

SIEBEL, A. M. *et al.* Rapamycin suppresses PTZ-induced seizures at different developmental stages of zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 139, p. 163-168, 2015.

SILVA, W. *et al.* Biotecnologia da vanilina: Uma revisão sobre suas características e atividades biológicas. *Estrabão*, v. 4, p. 112-124, 2023.

SOUSA, M. P. *et al.* Aspectos metabólicos das catequinas na obesidade e doenças cardiovasculares. *RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 16, n. 101, p. 397-408, 2022.

STANER, L. Sleep and anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. v.5, n.3. p.249-258. 2003.

SUBBIAH, S.; KAR, B. Adult zebrafish as a new animal model to study anxiety. *Asian Journal of Experimental Biology Science*. 4(2): 167-171. 2013.

TAFET, G. E.; NEMEROT, C. B. Pharmacological treatment of anxiety disorders: the role of the HPA axis. *Frontiers in Psychiatry*. v.11, p.1-11. 2020.

TEIXEIRA, P. T. F. A terapia cognitiva-comportamental e a relevância no processo terapêutico. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. Ano 06. Ed. 03. Vol. 01, pp. 86-97. 2021.

VENKATEISH, V. P. *et al.* Bioactives of *Lactuca sativa*: nutritional and clinical importance. *Advances in health and disease*, v. 33, 2021.

ZEKKORI, B. *et al.* Effect of hydro-alcohol solvent polarity on the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities of four Moroccan lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.): a comparative study. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, v. 13, n. 4, 2021.

ZHAO, XIN *et al.* "Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* 42.1 (2007): 71-76.

ZHANG, Q. *et al.* Cognitive behavioral therapy for depression and anxiety of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. ***Complementary Therapies in Clinical Practice***. V.39. 2020.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. ***Current protocols in food analytical chemistry***, v. 6, n. 1, p. I1-1, 2002.

WEI, R. *et al.* Simultaneous Determination of Panax notoginseng Total Saponins in Rabbit Tears by UPLC-QqQ-MS/MS and its Application to Pharmacokinetic Study. ***Journal of Chromatography B***, p. 123490, out. 2022.

YANG, Y. HERRUP, K. Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease***, v. 1772, n. 4, p. 457-466, 2007.

